Identifizierung und physikalische Kartierung von Genen auf dem zirkulären Chromosom aus Spinacia Oleracea Plastiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Diplom Biologe
Albert J. Driesel
aus Mainz

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544323_0035

Identifizierung und physikalische Kartierung von Genen auf dem zirkulären Chromosom aus Spinacia Oleracea Plastiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Diplom Biologe
Albert J. Driesel
aus Mainz

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 1979

Referent: Prof. Dr. R.G. Herrmann
Korreferent: Prof. Dr. W. Stubbe

ABKÜRZUNGEN

Å:	Ångström-Einheit
bp:	Basenpaare
cpDNA:	plastidäre DNA
cpm:	Zählimpulse pro Minute
d:	dalton
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
DNAase:	Desoxyribonuclease
DMSO:	Dimethylsulfoxyd
E.coli:	Bakterium Escherichia coli
EDTA:	Äthylendiamintetraessigsäure
Kd:	Kilodalton
Kbp:	Kilobasenpaare
Md:	Megadalton
mRNA:	Messenger-RNA
mtDNA:	mitochondriale DNA
Poly(A); Poly(U):	Polynucleotid, welches als Base nur Adenosin bzw. Uridin enthält
PPO:	2,5-di-phenyloxazol
RNA:	Ribonucleinsäure
RNAase:	Ribonuclease
rRNA:	ribosomale RNA
S:	Svedberg-Einheit
SDS:	Natriumdodecylsulfat
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TMV:	Tabakmosaikvirus
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA:	Transfer-RNA

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL und METHODEN	
Anzucht der Pflanzen	3
Isolation von Plastiden	3
Isolation und Reinigung der Ribosomen und deren Untereinheiten	5
RNA Extraktion, Fraktionierung und Identifizierung	6
Radioaktive Markierung	8
Isolation von Plastiden DNA	9
Restriktionsendonucleasen und Agarose-Gelelektrophorese	10
RNA - DNA Hybridisierung	12
Proteinsynthese in vitro und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
Elektronenmikroskopische Untersuchungen	15
Chlorophyllbestimmung	15
Lösungen und Reagenzien	15
ERGEBNISSE	
Die physikalische Karte der Spinat cpDNA	16
Lokalisierung der Gene für ribosomale RNA	21
Die RNA-Spezies aus Plastidenribosomen	21
Das rRNA-Operon	23
Genlokalisation von Transfer-RNAs	26
Die Transfer-RNA-Spezies aus Spinat Chloroplasten	26
Kartierung der tRNAs	27

Identifizierung und physikalische Kartierung
von Polypeptiden 37

Isolation und Translation von mRNA-Komponenten
aus Plastiden 37
Lokalisation der Gene von *in vitro* Translationsprodukten 42
Feinkarte des 33,5 und 55 Kd Polypeptids 47

Untersuchungen zur Expression plastidärer Gene während
der Transformation vom Etioplasten zum Chloroplasten 51

Anzucht von etiolierten Spinatkeimlingen 51
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an ergrünenden
Spinatkotyledonen 55
In vivo Markierungsexperimente an Spinatkeimlingen 65
Entwicklungsabhängige RNA- und Proteinsynthese 67

DISKUSSION 69

ZUSAMMENFASSUNG 81

LITERATURVERZEICHNIS 83

DANKSAGUNG 94

LEBENSLAUF

EINLEITUNG

Die Biogenese der autotrophen Eukaryontenzelle wird von drei genetischen Kompartimenten (Schnepf, 1965) gesteuert, dem Zellkern/Zytoplasma, der Plastide und dem Mitochondrium. Im Vergleich zur prokaryotischen Zelle, die nur ein genetisches Kompartiment darstellt, und zur heterotrophen Eukaryontenzelle besitzt die pflanzliche Zelle damit ein relativ komplexes, genetisches System. Während meiner Dissertation beschäftigte ich mich mit plastidären Erbträgern.

Das Interesse an plastidären und mitochondrialen Erbträgern wurde in den sechziger Jahren mit der Entdeckung von Nucleinsäuren in diesen Organellen neu geweckt (Ris & Plaut, 1962; Chun et al., 1963; Sager & Ishida, 1963). Seitdem werden diese Organellen einer intensiven molekularbiologischen Untersuchung unterzogen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der letzten 5 Jahre an der Plastide lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Das genetische System in der Plastide ist vollständig und wesentlich komplexer als ursprünglich angenommen. Neben Replikationsvorgängen (Kolodner & Tewari, 1975; Tewari et al., 1976), Transkriptions- (Bohnert et al., 1976; Weil et al., 1977; Hartley & Head, 1979) und Translationsprozessen, letztere finden an organelleigenen Ribosomen statt (Blair & Ellis, 1973; Chua & Luck, 1974; Bottemley & Whitfeld, 1979; Edelman & Reisfeld, 1978; Ellis & Barraclough, 1978), wurden auch noch enzymatische Aktivitäten für RNA- und Polypeptidreifung nachgewiesen (Bohnert et al., 1976; Edelman & Reisfeld, 1978; Chua, 1978; Reisfeld et al., 1978).

Der genetische Apparat in der Plastide ist prokaryotisch organisiert. So enthalten Plastiden zum Beispiel Ribosomen des 70S Typs, und die Proteinbiosynthese wird durch eine formylierbare tRNA für Methionin gestartet. Plastiden einer Spezies enthalten auch längen- und sequenzuniforme, zyklische DNA-Moleküle, die als Chromosomen bezeichnet werden können. Wie in prokaryotischen Zellen kann jedes dieser Moleküle die genetische Information des Plastoms tragen. Ringförmige cpDNAs wurden bei höheren und niederen Pflanzen gefunden (zur Obersicht siehe Herrmann et al., 1975).

Ein neuer Forschungsabschnitt in der Analyse von cpDNAs wurde, wie bei anderen DNAs auch, durch die Entdeckung von Restriktionsendonucleasen eingeleitet (Zusammenfassende Darstellungen über Restriktionsendonucleasen bei: Arber, 1974; Nathans & Smith, 1975). Die Anwendung dieser Enzyme bietet u.a. die Möglichkeit, physikalische Karten zu erstellen, die als Grundlagen für Genlokalisationen dienen können. Solche Karten existieren von den cpDNAs aus Zea mays (Bedbrook & Bogorad, 1976), aus Chlamydomonas reinhardii (Rochaix & Malnoe, 1978), aus Euglena gracilis (Gray & Hallick, 1976) und, aus unserem Labor, aus Spinacia oleracea (Herrmann et al., 1976).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themenkreise bearbeitet. Es sollten Gene des zirkulären Chromosoms aus Spinacia oleracea Plastiden identifiziert und auf dem Molekül lokalisiert werden. Ferner sollte ein experimenteller Ansatz zum Studium differentieller Genexpressionen an cpDNA gesucht werden.

Teile dieser Arbeit wurden in den letzten beiden Jahren auf verschiedenen Kongressen in Form von Abstracts, Postern oder Kurzvorträgen vorgestellt.

MATERIAL und METHODEN

Anzucht der Pflanzen

Als Versuchsobjekt dienten Keimlinge von Spinacea oleracea, die noch keine Primärblätter hatten. Das Material wurde im Langtag bei 20/15°C Tag/Nacht und 75% relativer Feuchte in Klimakammern herangezogen, vor dem Ernten für 72 Stunden verdunkelt und anschließend mit Weißlicht von etwa 10.000 Lux belichtet. Für Etiolierungsuntersuchungen wurden die Keimlinge 5 Tage im Dunkeln bei 22°C und 95 bis 98% rel. Feuchte unter Verwendung von Sicherheitslicht (Interferenz-doppellinienfilter, 510 nm, Jenaer Glaswerke, Schott & Söhne, Mainz, Kennwort DIL 510) auf Einheitserde Typ P als Substrat kultiviert. Das Saatgut (EWG-Norm D/H 6210, Fa. Sperling & Co, Lüneburg) wurde mit Orthocid 50 (Fa. Bayer, Leverkusen), einem metallfreien Fungizid, behandelt, um Pilzwuchs zu vermeiden.

Isolation von Plastiden

Die Keimlinge wurden im Verhältnis 1:1 (w/v) mit Isolationsmedium, enthaltend 0,3 M Mannit, 50 mM Tris/HCl (pH 7,6), 3 mM EDTA, 0,1% Albumin aus Rinderserum und 3 mM Mercaptoäthanol (Kolodner & Tewari, 1972), im Waring Blender für 5 Sekunden homogenisiert und anschließend durch 3 Lagen Gaze (20 µm Maschenweite; Schweizerische Seidengaze-Fabrik, Zürich) filtriert, um Geweberückstände abzutrennen. Aus dem Filtrat wurden die Plastiden durch eine kurzzeitige, hochtourige Zentrifugation sedimentiert (Christ-Zentrifuge, Junior 3, Ausschwingrotor 5020, Fa. Christ; Abb. 1, verändert nach Heber, 1973). Das Verfahren führte zu einer Anreicherung von Plastiden mit intakten Hüllmembranen, da diese infolge ihrer größeren Dichte und ihres geringeren Reibungswiderstandes schneller sedimentieren als zerstörte Organellen. Mitochondrien bleiben unter diesen Bedingungen im Oberstand (Herrmann et al., 1975).

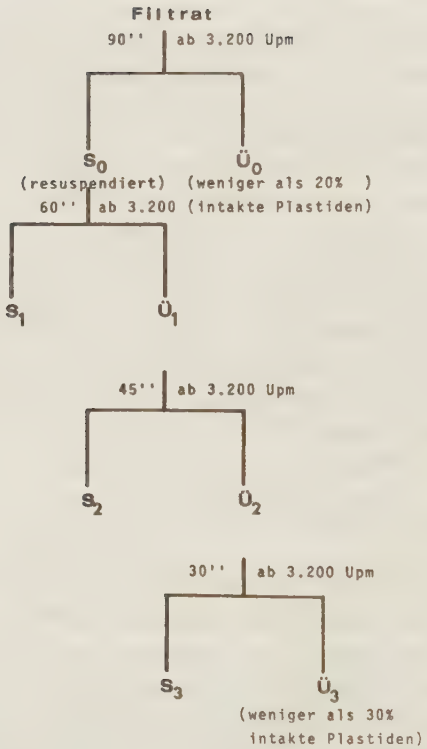


Abb. 1: Schema der differentiellen Kurzzeitzentrifugation zur Isolation von Plastiden. Die Sedimente S_1 bis S_3 enthielten mehr als 60% intakte Chloroplasten.

Nur solche Präparationen wurden verwendet, deren Organellen im Phasenkontrastmikroskop überwiegend glänzend (Kahn & von Wettstein, 1961), im Interferenzkontrast dagegen glatt erschienen (Schmitt & Herrmann, 1977), d.h. noch von Hüllmembranen umgeben waren. Sie werden in der Literatur als "intakt" bezeichnet (siehe u. a. Walker, 1971 oder Hall, 1972). Mit dieser Methode ließen sich Chloroplasten routinemäßig in guter Qualität und Ausbeute, stärkehaltige Etioplasten hingegen nur zu geringen Prozentsätzen mit intakten Hüllmembranen isolieren.

Isolation und Reinigung der Ribosomen und deren Untereinheiten

Die Chloroplastensedimente wurden in das oben angegebene Medium resuspendiert, das lediglich an Stelle von EDTA 10 mM $MgCl_2$ enthielt. Diese Magnesiumkonzentration war ausreichend, um bei der anschließenden Organellyse durch Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%; Payen & Dyer, 1971) die plastidären Monosomen zu stabilisieren. Der Lysevorgang fand bei 0^oC statt und wurde im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Membranstücke im Lysat wurden durch Zentrifugation bei 21.000 x g (Sorvall RC 2 B, Rotor HB-4) entfernt. Der Oberstand wurde über ein 2 ml Saccharosekissen (20% RNAase-freie Saccharose, Fa. Serva, in $MgCl_2$-haltigem Medium) geschichtet und 5 Stunden bei 125.000 x g (Wkf-Hitachi 65 P, 12x12 ml Winkelrotor RP 55 T) zentrifugiert. Das Ribosomensediment war im allgemeinen frei von Chlorophyll und wurde über kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten wie folgt weiter gereinigt.

Als Eckkonzentrationen für die Gradienten wurden 15 bzw. 45%-ige Saccharoselösungen verwendet, die 50 mM NH_4-Acetat, 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) und 6 mM $MgCl_2$ enthielten. Für die Trennung von Ribosomenuntereinheiten enthielten die Gradienten mehr NH_4-Acetat (300 mM). Konvexe, kontinuierliche

Gradienten wurden aus 4,5 ml 15%-iger und 7,5 ml 45%-iger Zuckerlösung in einem Gradientenformer hergestellt (Fa. ISCO, Modell 570). Die Gradienten wurden im 6x14 ml Ausschwingrotor bei 150.000 x g für 4 Stunden zentrifugiert (Wkf-Hitachi-Zentrifuge) und im Gradientenfraktionator (Fa. ISCO, Modell 640) mit der Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/Minute von unten nach oben fraktioniert. Die Extinktion wurde kontinuierlich bei 254 nm registriert.

RNA Extraktion, Fraktionierung und Identifizierung

Für Hybridisierungsstudien wurden verschiedene RNA-Spezies aus Plastiden benötigt. Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Plastidensedimente durch Zusatz von Lysemedium (1:1, v/v; 2% SDS, 150 mM NaCl, 150 mM Tris/HCl, pH 8,0) während der Resuspension lysiert. Das Lysat wurde mit 2 Volumen Phenol-Mix (100 g Phenol, 14 ml m-Kresol, 20 ml Lysemedium und 0,1 g 8-Hydroxychinolin, pH 8,4) versetzt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt (Parish & Kirby, 1966; Driesel, 1975). Die beiden Phasen der Emulsion wurden durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit Phenol-Mix und anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert, um daraus die weiteren Proteine zu entfernen. Analog wurde ribosomale RNA aus Ribosomen oder Ribosomenuntereinheiten isoliert. Aus der wässrigen Phase wurden die Nucleinsäuren in Anwesenheit von 0,1 M Kaliumacetat nach Zusatz von 2,5 Volumen Äthanol entweder über Nacht bei -18^{o}C oder nach 3 bis 4 Stunden bei -80^{o}C gefällt. Zur Entfernung mitpräzipitierter Salze wurde das RNA-Sediment bei 2 bis 4^{o}C fünfmal mit 70%-igem Äthanol gewaschen.

Die Auftrennung der Komponenten aus Gesamt-RNA Extrakt bzw. der RNA-Arten aus der großen ribosomalen Untereinheit, erfolgte über einen linearen, kontinuierlichen

Saccharosegradienten (Noll, 1967; Driesel, 1975). Dazu wurden je 6 ml einer 0,4 M und einer 1,3 M RNAase-freien Saccharoselösung (100 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) mit einem Gradientenformer vermischt. Die RNA (20 bis 40 µg) wurde in 100 µl sterilem bi-destilliertem Wasser aufgenommen, auf die auf 4 bis 6°C vorgekühlten Gradienten geschichtet und in der Wkf-Hitachi-Zentrifuge 65 P (Rotor RPS 25) für 20 Stunden bei 110.000 x g und 2 bis 4°C zentrifugiert. Die Gradienten wurden wie für die Ribosomen beschrieben fraktioniert und die RNA wieder ausgefällt.

Die niedermolekularen 4,5 und 5S rRNAs wurden über 10%-ige Polyacrylamid-Gele nach Bishop et al. (1967) getrennt, aus der Gelmatrix nach deren mechanischen Zerkleinerung mit Lysemedium eluiert und mit Phenol-Mix extrahiert.

Zur Isolation von tRNAs wurde ein Gesamt-RNA-Präzipitat in einer 1 M NaCl-Lösung gelöst und in Lösung gegangene tRNAs nach Zentrifugation aus dem Oberstand gewonnen. Um Kontaminationen mit DNA auszuschließen, wurde der Überstand durch Zugabe von sterilem bi-destilliertem Wasser (1:4, v/v) verdünnt und mit 50 µg/ml RNAase-freier DNAase I (E.C. 3.1.4.5., Fa. Boehringer, Code-Nr.: 15469) inkubiert. Die tRNA wurde anschließend auf DEAE-Cellulosesäulen nach Burkard et al. (1970) gereinigt.

Poly(A)-haltige RNA wurde aus den RNA-Präzipitaten durch Affinitätschromatographie über Poly(U)-Sepharose-4B Säulen (Fa. Pharmazia, Schweden) nach den Methoden von Lindberg und Person (1972) und Zeichner und Stern (1977), modifiziert nach Nellen (pers. Mitteilung), gewonnen. Jeweils 0,1 g Poly(U) Sepharose wurde in 2 ml TES-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) für 15 Minuten bei Zimmertemperatur gequollen und in Pasteurpipetten eingefüllt. Die Säulenfüllung wurde mit 4 Volumen TES-Puffer, der zusätzlich 0,1 M NaCl enthielt, äquilibriert. Die RNA-Präzipitate (40 bis 60 µg), in 1 bis 2 ml TES-NaCl-Puffer gelöst, wurden in 2 bis 3 Zyklen auf

die Säulen pipettiert. Die nicht adsorbierte RNA wurde mit zwei Säulenvolumen TES-NaCl-Puffer herausgewaschen und als Fraktion "poly(A^-)" bezeichnet. Die Elution der poly(A)-haltigen RNA (Fraktion "poly(A^+)") erfolgte mit zwei Säulenvolumen TES-Formamid-Puffer (1:9, v/v) bei 50°C.

Die Ribonucleinsäuren wurden gelelektrophoretisch auf Qualität und Reinheit geprüft. Die Präparation der Säulen- oder Plattengele erfolgte nach Bishop et al. (1967). Die Konzentrationen der Monomeren-Lösungen sowie die jeweiligen pherographischen Bedingungen sind in den Legenden der Absorptionsprofile aufgeführt.

Zur photographichen Dokumentation der RNA-Banden im Polyacrylamid-Gel wurde eine Zellulosedünnschichtplatte mit UV-Indikator (Fa. Macherey & Nagel, CER 300, UV 254) auf das Gel gelegt, mit UV-Licht von 254 nm durchstrahlt und die Fluoreszenzlöschung mit Agfa-Ortho-Film (Rotlichtfilter 3, Blende 8, 40 Sekunden) photographiert (Hartley, pers. Mitteilung).

Die Konzentrationsbestimmungen der gelösten RNA erfolgte spektralphotometrisch. Für 1 µg RNA/ml wurde bei 260 nm eine Absorption von 0,025 angenommen.

Radioaktive Markierung

Zur radioaktiven Markierung von RNA in vivo wurden die Keimlinge (zur Vermeidung von Lufteintritt ins Xylem) unter Wasser abgeschnitten und als kleine Sträußchen in Vasen gestellt, die die radioaktiven Vorstufen in sterilem bi-destilliertem Wasser enthielten. Zur Anwendung gelangten ^{3}H-Uridin (50-100 µCi/ml), ^{3}H-Orotsäure (50-200 µCi/ml) und ^{32}P-Orthophosphat (100-200 µCi/ml ; Fa. Amershan & Buchler, Braunschweig). Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden Proben (0,2 bis 1,0 ml) mit jeweils 10 ml

Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator KL 501, Fa. Koch-Light, Ltd., England) versetzt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt (Fa. Intertechnique, Frankreich).

Für die Lokalisierung der rRNA-, tRNA- und mRNA-Gene auf der cpDNA wurden die einzelnen RNA-Spezies in vitro mit ^{125}J (Fa. NEN, New England Nuclear, Boston, USA) nach Commerford (1971) und Prensky et al. (1973) wie folgt jodiniert. Dazu wurden in 10 µl 2 M Na-Acetat und 10 µl 0,8 M Essigsäure (pH 7,4) mit 25 µl 0,2 M KJ-Lösung, 25 µl 20 mM $TlCl_3$, 20 µl $Na^{125}J$ (entsprechend 1 mCi) und 110 µl der gewünschten RNA (in sterilem bi-destilliertem Wasser) vermischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 60°C inkubiert, im Eisbad auf 0°C abgekühlt und nach Zugabe von 10 µl 0,1 M Na_2SO_3-Lösung und 60 µl NH_4-Acetat/NH_4OH-Puffer (pH 9,6) nochmals 30 Minuten bei 60°C inkubiert und die Probe dann im Eisbad abgekühlt. Die Trennung der jodinierten RNA von ungebundenem $Na^{125}J$ erfolgte in 0,01 x SSC über eine Sephadex G25 Säule (10 cm x 1 cm) bei Zimmertemperatur. Die radiojodinierte RNA eluierte nach 6 ml. Diese Fraktion wurde durch sterile 0,22 µm Millex-Filter (Fa. Millipore, Frankreich) filtriert und nach Zusatz von 0,1 M Kaliumacetat (Endkonzentration) mit 2 Volumen Äthanol über Nacht bei -18°C präzipitiert.

Die spezifische Radioaktivität für die RNA-Spezies wurde nach Rawson & Boerma (1976) kalkuliert. RNA-Präparationen mit spezifischen Aktivitäten zwischen 2×10^6 und 3×10^7 Zerfälle pro Minute wurden zur Hybridisierung verwendet.

Isolation von Plastiden DNA

Hochmolekulare DNA aus intakten Plastiden wurde nach Herrmann et al. (1975) isoliert. Die Sedimente intakter Plastiden (siehe oben) wurden im Isolationsmedium resuspendiert, das auf 10 mM $MgCl_2$ eingestellt wurde. Verunreinigende Kern-

DNA wurde durch Inkubation mit 50 bis 100 µg/ml DNAase I (Fa. Boehringer, s.o.) für 30 Minuten im Eisbad entfernt. Anschließend wurde die Organellensuspension in dreifachem Volumen eiskaltem Saline-EDTA (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) überführt, zweimal darin gewaschen, in 10 ml resuspendiert und mit 1% SDS (Endkonzentration) bei Zimmertemperatur lysiert. Die Lyse wurde im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Kontaminierende Proteine und RNAs wurden durch Chromatographie über Hydroxyapatit-Säulen entfernt (Bernardi, 1971). Nach Dialyse gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) wurde die DNA in Anwesenheit von 0,2 M Kaliumacetat mit 2,5 Volumen Äthanol über Nacht bei -18°C gefällt.

Restriktionsendonucleasen und Agarose-Gelelektrophorese

Die Restriktionsendonuclease Sal I aus Streptomyces albus G wurde wie bei Groneberg (1976) beschrieben, die Endonuclease Xma I aus Xanthomonas malvacearum nach einer Methode von Endow und Roberts (1977) hergestellt. Andere Restriktasen wurden kommerziell erworben : Bam H I (Bacillus amyloliquefaciens H) und Hpa II (Haemophilius parainfluenzae) von Fa. Boehringer, Mannheim, Bgl II (Bacillus globigii), Kpn I (Klebsiella pneumoniae OK8), Pst I (Providencia stuartii 164) und Sac I (Streptomyces achromyogenes) von Fa. Bio Labs, Deverly, MA, USA. Die benutzten Verdauungsansätze sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Verdauungen wurden in einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz durch 10 µl Stoplösung (7 M Harnstoff, 50 mM EDTA, 50% Saccharose w/v, 0,1% w/v Bromphenolblau, Fa. Serva, Code-Nr.: 15375, pH 7,0) und 20 µl bi-destilliertem Wasser gestoppt.

Enzyme	Tris/HCl (- mM -)	pH	KCl (-	NaCl	$MgCl_2$ mM	DTT	MA -)	Enzymeinheiten pro µg cpDNA	Zeit (min)
Bam H I	6	7,5	20	-	6	6	-	3	10
Bgl II	10	7,4	6	-	10	1	-	5	60
Hpa II	10	7,5	-	-	10	1	-	1	30
Kpn I	6	7,5	-	6	6	-	6	5	60
Pst I	6	7,4	-	50	6	-	6	2	60
Sac I	10	7,5	-	20	6	-	6	2	60
Sal I	10	7,6	-	150	6	-	6	2	60
Xma I	10	7,5	-	100	6	-	6	2	60

Tabelle 1: Verdauungsansätze für Restriktionsendonucleasen bei 37°C.

Die aus der Enzymverdauung resultierenden DNA-Fragmente wurden jeweils nach zu erwartenden Molekulargewichten auf Agarose-Plattengelen der Größe 20 x 20 x 0,5 bis 1,0 cm aufgetrennt (0,6 bis 2,4%-ige Agarose, SeaKem, Fa. Marine Colloids, Inc., Rockland, Main, USA). Die Gele wurden mit Elektrophoresepuffer (40 mM Tris/HCl, pH 7,5, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA) stets frisch präpariert und bei Zimmertemperatur mit 40 bis 50 mA (ca. 40 bis 50 Volt) pherographiert, bis der Markerfarbstoff nach ungefähr 16 bis 18 Stunden an das Gelende gewandert war.

Die Agarosegele wurden mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Fa. Serva) in Elektrophoresepuffer für 30 bis 60 Minuten angefärbt, 30 Minuten gewässert und die unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden (Lampe 354 nm, Fa. Hormuth-Vetter, Wiesloch) mit Polaroidfilm Typ 107 (Positiv-) oder 665 (Negativfilm) photographiert (Rotlichtfilter 3, Blende 4,5, Belichtung etwa 1 Sekunde bzw. etwa 2,5 Minuten).

Die Wanderstrecke der DNA-Fragmente vom Startpunkt wurden in Zentimeter protokolliert. Die Molekulargewichte der cpDNA-Banden konnten aus einer Eichkurve ermittelt werden. Dazu wurde der Logarithmus der DNA-Längenstandards I und II (Fa. Boehringer, Lambda-DNA verdaut mit den Restriktionsendonucleasen Eco R I bzw. Hind III) gegen die Wanderungsstrecke der Fragmente aufgetragen (Weber & Osborn, 1969).

RNA - DNA Hybridisierung

Für die anschließenden Hybridisierungsstudien wurden die auf den Agarosegelen fraktionierten DNA-Fragmente auf Nitrozellulosestreifen (Fa. Sartorius, Typ 11325, Porengröße 0,3 µm) nach der Methode von Southern (1975) transferiert. Zur Denaturierung der DNA wurden die Gele in einer Lösung von 0,3 M NaOH und 0,6 M NaCl für 30 bis 45 Minuten untergetaucht, anschließend in Neutralmix (1 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,05% SDS) für 45 Minuten dialysiert (1 : 10,

v/v). Das Gel wurde dann auf ein saugkräftiges Haushaltsschwammtuch gelegt, das in 16 x SSC getränkt war, und mit der Nitrozellulosefolie bedeckt, die für 1 Stunde mit 3 x SSC benetzt war. Durch einen ungefähr 15 cm hohen Papierhandtuchstapel, der unter geringem Druck (ca. 300 g) auf das Gel gelegt wurde, entstand ein ausreichend großer Sog, durch den die cpDNA-Fragmente aus der Gelmatrix an das Filter gebunden werden konnten. Die zunächst für 2 Stunden luftgetrockneten Filterstreifen wurden für 4 Stunden unter Vakuum bei 81°C behandelt.

Die DNA-haltigen Nitrozellulosestreifen wurden mit 3 x SSC angefeuchtet, dann die radiojodinierte RNA in den entsprechenden Inkubationslösungen auf die Filterstreifen pipettiert, die Nitrozellulosestreifen in Haushaltsfolie eingeschweißt und im Trockenschrank wie folgt inkubiert.

	Inkubationslösung	Zeit (Stunden)	Temperatur
rRNA	3 x SSC	6	67°C
tRNA	2 x SSC, 50% Formamid	24	37°C
mRNA	3 x SSC	6	60°C

Nach der Inkubationsperiode wurden die Filter in je 2 Liter 2 x SSC bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur gespült, 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit RNAase A (10 µg/ml; Fa. Boehringer, Code-Nr.: 109177; E.C. 3.1.4.22) behandelt und anschließend zweimal in 2 x SSC (jeweils ca. 1 Liter) gewaschen. Die luftgetrockneten Filterstreifen wurden zur Autoradiographie auf Glasplatten fixiert und mit sensitivierten Kodak X-Ray Filmen (Sensitivierung: Lichtblitz bei Blende 16, Entfernung ca. 2 Meter, Gelbfilter, 0,1 Sekunde; Lasky & Mills, 1975) je nach Aktivität für 3 bis 14 Tage exponiert.

Proteinsynthese in vitro und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Plastidäre RNA-Spezies wurden in vitro im kommerziell erhältlichen RNA programmierten Translationssystem aus Kaninchen Reticulozyten (Fa. NEN, ^{35}S-Methionin) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Inkubationsansatz enthielt in 25 µl 0,5 bis 2,0 µl RNA in sterilem bi-destilliertem Wasser, 10 µl Reticulozytenlysat mit inaktivierter endogener mRNA-Aktivität, 8,5 µl ^{35}S-Methionin (entsprechend 50 µCi), 2 µl Translationscocktail (Fa. NEN), 2 µl 1 M Kaliumacetat- und 0,5 µl 32,5 mM Magnesiumacetatlösung.

Die in vitro synthetisierten radioaktiven Polypeptide wurden auf 15%-igen SDS/Polyacrylamid-Plattengelen (20 x 18 x 0,1 cm) analysiert (Laemmli, 1970; Laemmli & Favre, 1973) und durch Fluorographie sichtbar gemacht (Bonner & Laskey, 1975; Laskey & Miles, 1975). Dazu wurden die Plattengele in einem vierfachen Volumen DMSO 2 Stunden dialysiert und anschließend in 20% (w/v) PPO in DMSO (22,2%, w/v) für 3 Stunden untergetaucht. Das Gel wurde danach für ungefähr 2 Stunden gewässert, wodurch das PPO im Gel kristallisierte. Das Polyacrylamidgel wurde dann auf ein angefeuchtetes Whatman 3MM Papier ausgebreitet und auf einer porösen Polyäthylenplatte unter Vakuum getrocknet.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der translatierten Polypeptide wurden die Eichproteine für die SDS-Gelelektrophorese der Fa. Boehringer, Albumin aus Rinderserum (MW 68.000), Trypsin-Inhibitor (MW 21.500), Cytochrom c (MW 12.500) sowie das Fraktion-I-Protein (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase aus Spinacia) copherographiert. Zur Sichtbarmachung der nicht radioaktiven Eichproteinbanden wurden die Gele in einer Färbelösung (0,25% w/v Coomassie brilliant blue R 250, Fa. Serva, Code-Nr.: 17525, 50% v/v Methanol, 7% v/v Essigsäure) angefärbt (Koenig et al., 1970) und in 5% Methanol und 5% Eisessig

entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einen Polaroidfilm 107 (Mattscheibe, Gelbfilter, Blende 8, 1/4 Sekunde) photographiert.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden kleine Gewebestücke von Kotyledonen (2 bis 3 mm) in 4% Glutaraldehyd und 1% OsO_4 bei 0^oC fixiert. Nach der Entwässerung der Präparate in ansteigender Alkoholreihe wurde die Einbettung in Epon durchgeführt (Spurr, 1968). Die Präparation der Schnittbänder erfolgte am Ultramikrotom (Fa. LKB, UltrotomeIII) mit Hilfe eines Ge-Fe-Ri-Diamantmessers. Die Schnitte (Dicke 500 bis 1000 Å) wurden mit Bleicitrat kontrastiert und im Philips EM 300 untersucht.

Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllmenge wurde nach Arnon (1949) bestimmt.

Lösungen und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysereine Lösungen und Reagenzien der Fa. E. Merck, Darmstadt, verwendet.

ERGEBNISSE

Die physikalische Karte der Spinat cpDNA

Eine physikalische Karte eines Chromosoms ist Voraussetzung für die Lokalisation von Genen. Solche Karten werden heute am elegantesten mit Restriktionsendonucleasen konstruiert. Endonucleasen des Typs II sind sequenzspezifische DNAasen, die kurze, definierte Sequenzen erkennen und doppelsträngige DNA an diesen Stellen schneiden. Jede Schnittstelle eines solchen Enzyms stellt somit einen topographischen Marker dar, der unter anderem zu Funktionen des Moleküls in Beziehung gesetzt werden kann. Die Seriierung der Schnittstellen am zyklischen Molekül kann durch reziproke Verdauung der DNA-Fragmente mit zwei oder mehreren Endonucleasen erhalten werden (Smith & Birnstiel, 1975). Am zirkulären Chloroplasten-Chromosom des Spinats sind etwa 150 Schnittstellen von insgesamt 10 Enzymen lokalisiert. Diese Karte stand für meine Untersuchungen zur Verfügung (Crouse et al., 1978; Herrmann, pers. Mitteilung); Abbildung 2 zeigt die Schnittstellen von 4 Endonucleasen am cpDNA-Molekül.

Das hervorstechende Charakteristikum der cpDNA aus Spinacia ist eine invers angeordnete Sequenzduplikation, die in Abbildung 2 durch Verdickung entsprechender Kreisabschnitte hervorgehoben ist. Eine Kopie der Repetition macht ungefähr 15% des gesamten Moleküls aus und reduziert somit seine potentielle Kodierungskapazität um diesen Anteil. Die repetitiven Bereiche (jeweils 15 Md) liegen nicht nebeneinander, sondern werden durch sogenannte "single-copy"-Bereiche von ungefähr 12 und 52 Md voneinander getrennt. durch diese Anordnung wird das Chromosom in vier Segmente gegliedert.

Abb. 2: Physikalische Karte der zirkulären cpDNA von Spinat, konstruiert mit vier Restriktionsendonucleasen. Die Symbole bezeichnen die Schnittstellen der Enzyme: Sal I = ▼, Pst I = ◆, Kpn I = | und Xma I = ▼.

Für die Kartierung von Genen mittels der Southern-Methode wurden in dieser Arbeit 4 Restriktionsendonucleasen nach zwei Gesichtspunkten ausgewählt: Die Bruchstücke, die sie mit cpDNA erzeugen, sollten sich in ihrem Molekulargewicht so unterscheiden, daß sie sich in einem Agarosegel im elektrischen Feld ausreichend voneinander trennen. Außerdem sollten die Schnittstellen der verschiedenen Enzyme am Molekül möglichst weit voneinander entfernt sein. Beides erleichtert die physikalische Kartierung von Genen. Das Spaltmuster dieser Endonucleasen mit Spinacia cpDNA ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Für die Restriktionsendonucleasen Sal I und Kpn I wurden jeweils 12 Fragmente erhalten, für Pst I 10 Banden und für Xma I 20 DNA-Bruchstücke. Die mit allen vier Enzymen erhaltenen DNA-Segmente sind gewöhnlich kleiner als 5×10^6 dalton. Jeder interessierende Bereich des Moleküls kann darüber hinaus durch Nachverdauung von Subfragmenten mit geeigneten Restriktionsendonucleasen feiner kartiert und somit der Genlocus weiter eingeengt werden.

Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich entstehen bei der Verdauung der cpDNA mit den vier genannten Endonucleasen die Fragmente in stöchiometrischen Mengen, da ihre Intensität mit vermindernder Größe abnimmt. Aus der Summe der Banden ergibt sich das Molekulargewicht des zirkulären Moleküls mit ungefähr 95 Md (140 Kbp), dies zeigt Tabelle 2. Dies beweist die Sequenzuniformität der zirkulären DNA-Moleküle dieser Spezies (siehe Diskussion). Die Molekulargewichte der einzelnen cpDNA-Banden wurden durch Coelektrophorese mit DNA-Fragmentstandards ermittelt (s. Material und Methoden, Seite 12). Sie sind in abnehmender Größe ihrer Molekulargewichte in Tabelle 2 erfaßt und numeriert.

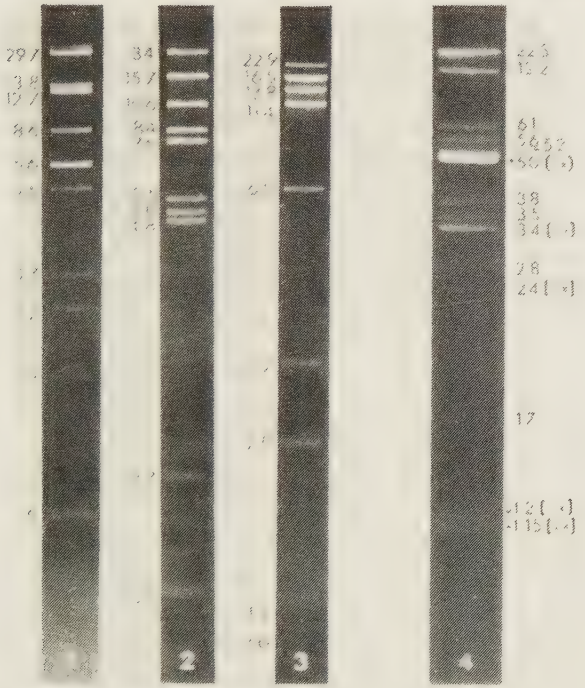


Abb. 3: Charakteristisches Spaltmuster von Spinacia cpDNA nach Verdauung mit den 4 Restriktionsendonucleasen: 1 = Sal I, 2 = Pst I, 3 = Kpn I und 4 = Xma I. Die Auftrennung erfolgte bei 45 mA auf einem 0,65%-igen Agarosegel bei Zimmertemperatur (Laufzeit 16 Stunden). Die Molekulargewichte der DNA-Banden sind in Md angegeben.

Tabelle 2: Molekulargewichte (x 10^6 d) der doppelsträngigen cpDNA-Fragmente nach Verdauung mit den 4 Enzymen. In den Klammern ist die Stöchiometrie der Banden angegeben.

Banden Nr.	Restriktionsendonuclease Sal I	Pst I	Kpn I	Xma I
1	29,7	34,0	22,9	22,3
2	13,8	15,7	16,5(2)	12,2
3	12,7	10,6	13,8	6,1
4	8,6	8,4	11,4	5,6
5	6,6(2)	7,6	6,0	5,2
6	5,6	5,5	2,7	5,0(3)
7	3,7	5,0	2,0	3,8
8	3,2	4,8	1,1	3,5
9	2,5	1,7	1,0	3,4(2)
10	1,5	1,25	0,5(2)	2,8
11	0,45			2,4(2)
12				1,7
13				1,2(2)
14				1,15(2)
Summe der Molekular-gewichte:	94,95	94,55	94,90	94,50
Summe der Fragmente:	12	10	12	20

Zur physikalischen Kartierung von Genen (und ggf. deren Identifizierung) auf der Spinat cpDNA wurden folgende Wege eingeschlagen:

1.) Hybridisierung radiojodinierter, spezifischer RNA-Arten mit DNA-Fragmenten bekannter Position im Plastidenchromosom.
2.) Für RNAs mit "messenger"-Eigenschaften ist dieses Verfahren allein nicht ausreichend. Es ist zusätzlich erforderlich, das Produkt der jeweiligen isolierten RNA-Art zu fassen und zu identifizieren. Dies wurde durch Translation fraktionierter Gesamt-RNA in zellfreien, rekonstitutiven in vitro Ansätzen sowie durch gelelektrophoretische immunologische und proteolytische Charakterisierung der Syntheseprodukte erzielt.

Lokalisierung der Gene für ribosomale RNA

Die RNA-Spezies aus Plastidenribosomen

Aus den Untereinheiten plastidärer 70S Ribosomen des Spinats lassen sich 4 RNA-Arten, neben den hochmolekularen 23S und 16S rRNAs auch die niedermolekularen 5S und 4,5S rRNAs isolieren. Die 4,5S RNA hatte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit unabhängig von zwei anderen Labors (Dyer & Bowman, 1976; Whitfeld et al., 1976) als Bestandteil plastidärer Ribosomen nachgewiesen und zeigen können, daß sie wie die 5S und 23S RNA der großen (50S) Untereinheit entstammt (Driesel, 1975). Zur Lokalisierung der Gene wurde die 23S rRNA durch Auftrennung der rRNA der großen Untereinheit wie üblich über Saccharosegradienten rein dargestellt (Herrmann et al. 1976). Die niedermolekularen rRNA-Spezies lassen sich auf 10%-igen Polyacrylamidgelen auftrennen und daraus extrahieren (Abbildung 4). Die 16S rRNA konnte direkt aus der kleinen (30S) Untereinheit gewonnen werden.

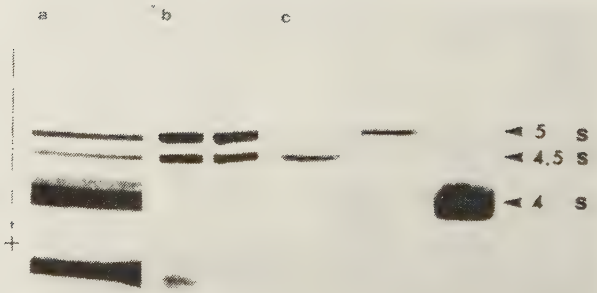


Abb. 4: Gelelektrophoretische Auftrennung niedermolekularer RNAs aus Spinatchloroplasten (10%-iges Gel, 4°C, 20 Stunden, 120 mA, 150 V).
a) gesamte niedermolekulare RNA aus Chloroplasten,
b) 4,5S und 5S rRNA aus der großen Untereinheit,
c) Reindarstellung von 4,5S, 5S und 4S RNAs.

Das rRNA-Operon

Saturierungshybridisierungen mit den radiojodinierten RNAs hatten gezeigt, daß die Gene für die 23S und 16S rRNAs zweifach pro Molekül vorhanden sind (Bohnert et al., 1976; Hobom et al., 1976). Die physikalische Kartierung bestätigte dies (Crouse et al., 1978; Whitfeld et al., 1978): die Gene für die ribosomalen RNAs liegen in der Sequenzrepetition, jeweils in Gruppen zusammengefaßt und nahe dem kleinen "single-copy"-Segment. Sie nehmen etwa 35% der Repetition ein, und beide Gruppen sind entsprechend der Organisation der Duplikation invers angeordnet (vgl. Abbildung 5). Wie frühere Untersuchungen ergeben hatten, stellt jede Gruppe eine Transkriptionseinheit dar (Hartley & Ellis, 1973; Bohnert et al., 1974; 1976).

Die Reihenfolge der rRNA-Gene innerhalb des rDNA-Bereichs wurde durch Feinkartierung ermittelt. Sie lautet in Transkriptionsrichtung (Bohnert et al., 1976) 16S-, 23S- und 5S-rRNA Gen (Crouse et al., 1978). Die DNA Sequenzen für die 16S und 23S rRNAs sind durch etwa 1850 Basenpaare voneinander getrennt, die als interzistronischer, transkribierter "spacer" bezeichnet werden können. Die Gene für 23S-, 16S- und 5S RNA sind einfach , die 4,5S rRNA ist hingegen wenigstens in zwei Kopien pro rRNA-Operon vorhanden (Crouse et al., 1978), von diesen dürfte eine innerhalb der 23S rRNA-Sequenz, die andere möglicherweise zwischen der 23S und 5S rRNA anzuordnen sein (Bohnert et al., 1979; vgl. hierzu Abbildung 6). Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

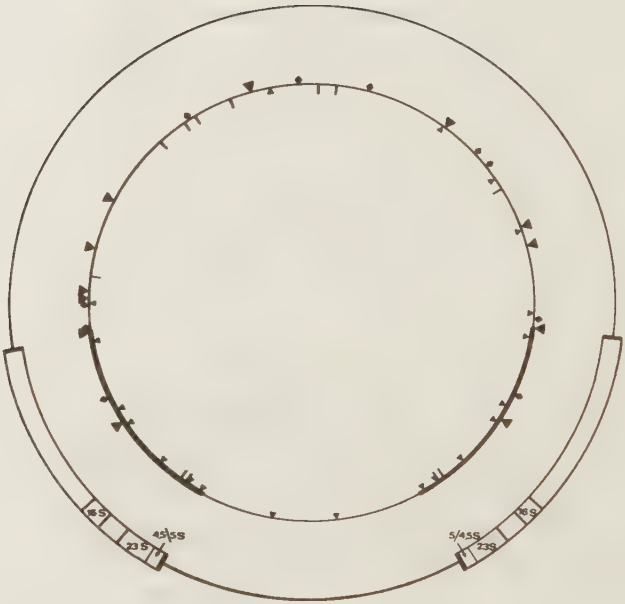


Abb. 5: Die Lage der Gene für die ribosomalen RNAs auf der physikalischen Karte der Spinacia cpDNA. Die Symbole für die Schnittstellen der vier Restriktionsendonucleasen entsprechen denen in Abbildung 2.

Abb. 6: Feinkarte des rRNA-Operon.
Der dicke Abschnitt stellt eine Kopie der Sequenzrepetition dar, nach links schließt sich die große - nach rechts die kleine "single-copy"-Region an. Die Schnittstellen weiterer, für die Feinkartierung notwendiger Restriktionsendonucleasen, die nicht in Abbildung 2 enthalten sind, sind vermerkt.

Genlokalisation von Transfer-RNAs

Die Transfer-RNA-Spezies aus Spinat Chloroplasten

Zur Identifizierung der plastidären tRNAs und Lokalisierung ihrer Gene auf der cpDNA wurden aus intakten Chloroplasten die 4S RNA-Populationen isoliert. Sie konnten auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen (Fradin et al., 1975) in ungefähr 35 Komponenten zerlegt werden (siehe Abbildung 7). Im Vergleich dazu ergab gesamte 4S RNA aus Spinatblattgewebe mit gleicher Methode mindestens 80 Flecken. Von den 35 plastidären 4S RNAs konnten durch Andrê Steinmetz (C.N.R.S, Universität Straßburg) durch spezifische Beladung mit Aminosäuren unter Verwendung von Chloroplasten- oder E.coli-Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bisher 27 als tRNA-Spezies für 16 Aminosäuren identifiziert werden. Keine der identifizierten tRNAs konnte mit mehr als einer Aminosäure beladen werden.

Nur eine einzige tRNA Art wurde bislang für folgende Aminosäuren gefunden: Alanin, Asparagin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan und Tyrosin, zwei Isoakzeptoren hingegen liegen für Arginin, Glycin, Isoleucin, Threonin sowie Valin vor und drei für Leucin, Methionin und Serin. Noch nicht identifiziert werden konnten die tRNAs für Asparaginsäure, Cystein, Glutamin und Glutaminsäure (siehe auch Tabelle 3).

Von den 13 weiteren nicht identifizierten Flecken sind die ersten 5 (A bis E) vermutlich keine tRNAs. Aufgrund ihrer geringen Mobilität im Gel müssen sie größer als 4S sein. Sie stellen entweder Abbauprodukte der 23S rRNA oder von mRNA-Komponenten dar, wahrscheinlicher aber die 4,5S und 5S RNAs plastidärer Ribosomen. Diese Flecken verschwinden nämlich, wenn 4,5S und 5S RNA vor der Auftrennung der 4S RNAs in einem 10%-igen Polyacrylamidgel (vgl. Abbildung 4, Seite 22) elektrophoretisch entfernt werden. Die auch noch nicht identifizierten Flecken H bis K konnten bei verschiedenen Ex-

perimenten stets radiojodiniert werden. Sie gelten als die Kandidaten für die Isoakzeptoren der vier Aminosäuren Asparaginsäure, Cystein, Glutamin und Glutaminsäure. Die Flecken F, G, L und M konnten entweder nicht in ausreichender Menge für Radiojodinierung erhalten werden oder nicht jodiniert werden. Die Komponenten F, G und M ließen sich nur schwach anfärben (gepunktete Flecken, siehe Abbildung 7). Sie waren auch nicht in allen Präparationen nachweisbar und könnten Abbauprodukte labiler 4S RNAs darstellen.

Für die Kartierungsstudien wurden die Hauptkomponenten aus dem Gel eluiert und radiojodiniert.

Kartierung der tRNAs

Wie für die Lokalisierung der rRNA-Gene wurden die einzelnen radiomarkierten 4S RNA-Spezies gegen Restriktionsfragmente der cpDNA hybridisiert. Von den 27 identifizierten tRNA-Arten konnten bislang 23 in Hybridisierungsstudien eingesetzt werden; die spezifische Radioaktivität der tRNAs für die Aminosäuren Arginin ($tRNA^{Arg}_{2}$), Prolin, Lysin und Valin ($tRNA^{Val}_{2}$) und die 4S RNAs der Flecken F, G, L und M war zu gering. Auch bei längerer Exposition in Autoradiogrammen konnten mit diesen tRNA- bzw. 4S RNA-Arten keine (eindeutigen) Ergebnisse erzielt werden. Von den 13 nicht identifizierten 4S RNA-Flecken konnten bisher 4 lokalisiert werden (H bis K). Die Ergebnisse der Autoradiographien, d.h. der Hybridisierungen der tRNAs zu cpDNA-Fragmenten nach Verdauung der DNA mit den Restriktionsendonucleasen, sind nachfolgend tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 4). Die Positionen der tRNA-Gene auf der physikalischen Karte des zirkulären Plastidenchromosoms zeigt Abbildung 8.

Abb.7: Zweidimensionale, gelelektrophoretische Trennung von 4S RNA aus Spinatchloroplasten in Polyacrylamid-Plattengelen (Skizze nach Steinmetz). Die 4S RNAs wurden nach Anfärbung mit Methylenblau sichtbar gemacht. Die RNA-Komponenten mit geringen Konzentrationen sind durch gepunkelte Flecken gekennzeichnet. Trennbedingungen (Fradin et al. 1975): 1. Dimension - 10% Polyacrylamid, 40 Stunden, 450 V, 2. Dimension - 20% Polyacrylamid, 140 Stunden, 350 V.

tRNA spezifisch für folgende Aminosäuren:	Isoakzeptoren (identifiziert)	Isoakzeptoren (genlokalisiert)	Genloci-Minimum
Alanin (Ala)	1	1	1
Arginin (Arg)	2	1	1
Asparagin (Asn)	1	1	1
Asparaginsäure (Asp)	-	-	-
Cystein (Cys)	-	-	-
Glutamin (Gln)	-	-	-
Glutaminsäure (Gln)	-	-	-
Glycin (Gly)	2	2	1
Histidin (His)	1	1	1
Isoleucin (Ile)	2	2	4
Leucin (Leu)	3	3	3
Lysin (Lys)	1	-	-
Methionin (Met)	3	3	2
Phenylalanin (Phe)	1	1	1
Prolin (Pro)	1	-	-
Serin (Ser)	3	3	2
Threonin (Thr)	2	2	1
Tryptophan (Trp)	1	1	1
Tyrosin (Tyr)	1	1	1
Valin (Val)	2	1	1
Total: 20	27	23	21

Tabelle 3: Anzahl der identifizierten und genlokalisierten tRNA-Spezies für jede der 16 Aminosäuren. Fälle, in denen bisher keine Ergebnisse erhalten wurden, sind mit "-" gekennzeichnet.

4S RNA spezifisch für	Molekulargewichte (x 10^6d) der Chloroplasten DNA-Fragmente nach Verdauung mit: Sal I	Pst I	Kpn I	Xma I
Ala	12,7	-	6,0	-
Arg 1	-	-	13,8	-
Arg 2	-	-	-	-
Asn	12,7	15,7	11,4	-
Gly 1	1,5*	-	-	-
Gly 2	1,5*	-	-	-
His	5,6	-	-	-
Ile 1	6,6	5,5	16,5	-
		5,0	22,9	
Ile 2	29,7	34,0	16,5	2,4
			22,9	
Leu 1	13,8	7,6	6,0	22,3
Leu 2	6,6	34,0	16,5	5,0
			22,9	1,2
Leu 3	6,6	-	-	-
Lys	-	-	-	-
Met 1	13,8	-	13,8	-
Met 2	12,7	-	2,7	-
Met 3	13,8	-	13,8	-
Phe	12,7	7,6	6,0	22,3
Pro	-	-	-	-
Ser 1	13,8	-	13,8	-
Ser 2	13,8	7,6	6,0	12,2
Ser 3	13,8	-	13,8	12,2
Thr 1	13,8	7,6	6,0	-
Thr 2	13,8	7,6	6,0	12,2
Trp	12,7	-	6,0	-
Tyr	13,8	8,4	13,8	12,2
Val 1	12,7	7,6	2,7	22,3
Val 2	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
H	12,7	-	6,0	-
I	12,7	-	6,0	-
J	-	-	6,0	-
K	13,8	8,4	13,8	-
L	-	-	-	-
M	-	-	-	-

Tabelle 4: Hybridisierung der 4S RNAs zu cpDNA-Fragmenten nach Verdauung der DNA mit Restriktionsendonucleasen. Das Zeichen "-" bedeutet "nicht getestet". (* Ergebnisse von Filterhybridisierungsexperimenten mit ^{32}P markierter tRNA an isolierte Fragmente).

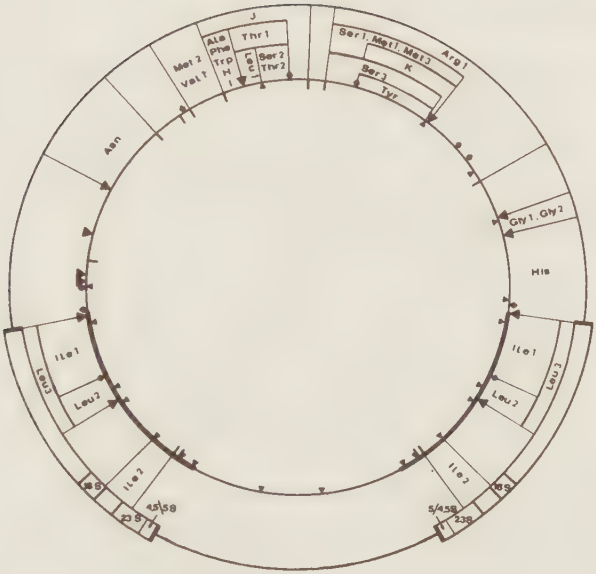


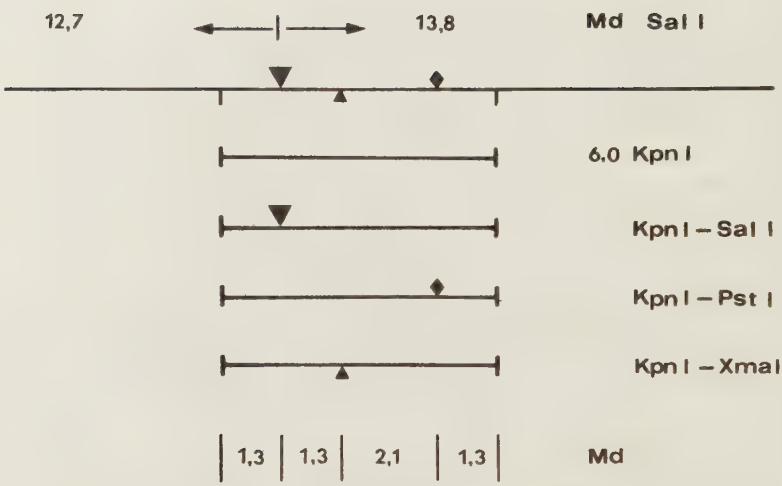
Abb. 8: Lokalisierung der 4S RNA-Gene auf der physikalischen Karte von Spinacia cpDNA. Die kleinste Region, an der die Hybridisierung für eine tRNA-Art erzielt wurde, ist mit dem entsprechenden Aminosäurekürzel bezeichnet. Mit den Buchstaben H bis K sind die Genorte für die noch nicht identifizierten 4S RNA-Flecken gekennzeichnet. Die Schnittstellen für die vier Restriktionsendonucleasen sind wie in Abb. 2 symbolisiert.

Der Vergleich mit der physikalischen Karte zeigt, daß cpDNA-Fragmente, erhalten mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen, zu denen eine gegebene tRNA hybridisierte, immer einen gemeinsamen, überlappenden Bereich hatten. Dies ist ein guter Hinweis für die Spezifität der Reaktion.

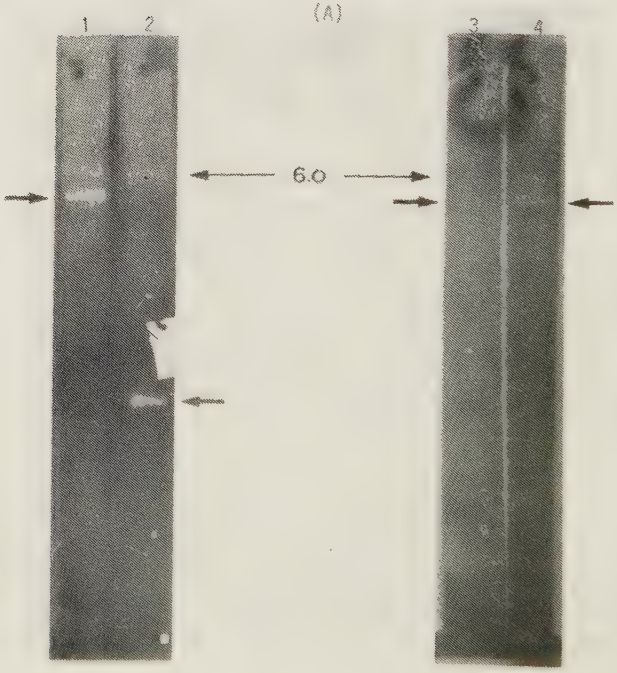
Im einzelnen können folgende Ergebnisse aus der Kartierungsstudie für tRNAs festgehalten werden:
Erstens, die tRNA-Gene liegen überwiegend im großen "single-copy"-Bereich des Moleküls. Auch die invers angeordneten Sequenzrepetitionen enthalten tRNA-Gene. Im kleinen "single-copy"-Segment wurden keine Gene gefunden.
Zweitens, neun tRNAs und drei nicht identifizierte 4S RNAs (H, I und J) hybridisieren zu einem einzigen Fragment, dem 7,6 Md Pst I Fragment. Ihre Gene scheinen daher gehäuft zu sein. Zu deren feineren Kartierung wurde das 6,0 Md Kpn I Fragment, welches das 7,6 Md Fragment überlappt (vgl. Abb. 2), nach Kpn I Verdauung der cpDNA isoliert und mit Sal I oder Pst I nachgespalten (siehe Abb. 9).
Drittens, die Kartierungsanalyse läßt Einsichten in die Gendosis einzelner tRNAs zu. Verschiedene tRNA-Isoakzeptoren für eine bestimmte Aminosäure, wie etwa im Falle des Glycins, hybridisierten zum gleichen DNA-Fragment (siehe Diskussion), aber es gibt tRNAs für andere Aminosäuren, für die mindestens zwei, drei oder vier Gene pro DNA-Molekül sicher nachweisbar waren. So konnte z. B. das Gen für die $tRNA^{Ser}_{2}$ auf einem anderen Fragment lokalisiert werden als das (oder die) von der $tRNA^{Ser}_{1}$ oder der $tRNA^{Ser}_{3}$, die beide auf dem gleichen Fragment im großen "single-copy"-Bereich liegen; dies ergibt mindestens zwei Gene für diese tRNAs. Entsprechend hybridisierte die $tRNA^{Met}_{2}$ an anderer Stelle als die $tRNA^{Met}_{1}$ und die $tRNA^{Met}_{3}$. Der tRNA-Isoakzeptor für die $tRNA^{Leu}_{1}$ liegt ebenfalls im großen "single-copy"-Segment, während die $tRNA^{Leu}_{2}$ und die $tRNA^{Leu}_{3}$ in der Sequenzinversion anzuordnen sind, und zwar in beiden Kopien. Dies ergibt mindestens drei Gene für die tRNAs für die Aminosäure Leucin. Die tRNA-Gene

für Leucin in der Repetition liegen mindestens 2,6 Md vom rRNA-Operon entfernt. In der Sequenzinversion hybridisierten auch die $tRNA^{Ile}_{1}$ und die $tRNA^{Ile}_{2}$. Die erste ebenfalls außerhalb, die zweite im Bereich des rRNA-Operon, dem 2,4 Md Xma-Fragment. Die Gene der Isoakzeptoren für die $tRNA^{Leu}_{2}$ und die $tRNA^{Leu}_{3}$ sowie für die $tRNA^{Ile}_{1}$ und die $tRNA^{Ile}_{2}$ liegen in beiden Kopien der Repetition vor. Dies konnte durch Hybridisierung der entsprechenden tRNAs auf den Fragmenten Kpn I 22,9 und 16,5 Md bzw. Pst I 5,5 und 5,0 gezeigt werden, die Teile beider Arme der Sequenzrepetition trennen. Die Schnittstellen der Endonuclease Kpn I für diese Fragmente liegen einmal offenbar an identischer Stelle innerhalb der Sequenzinversion(im Gen für die 23S rRNA),zum anderen in der großen "single-copy"-Region, dort aber jeweils verschieden weit vom repetitiven Segment entfernt. Für die Pst I Schnittstellen gilt vergleichbares; die Schnittstellen in der Repetition liegen jedoch ausserhalb der rDNA-Region. Für die $tRNA^{Ile}$ müssen demzufolge mindestens 4 Gene, jeweils 2 in jedem Arm der Sequenzrepetition, vorhanden sein (vgl. Abbildung 10). In der Tabelle 3 sind die mindest Gendosen der einzelnen tRNAs für die entsprechenden Aminosäuren zusammengefaßt.

Viertens, von besonderem Interesse war der Befund, daß die $tRNA^{Ile}_{2}$ zu dem Xma I Fragment von 2,4 Md hybridisierte. Dieses Fragment ist 3.850 bp lang, zweimolar und enthält einen Teil der Gene für die 16S rRNA (ca. 100 bp) sowie ungefähr 1900 bp von dem presumptiven 5'-Ende der 23S rRNA. Die restlichen 1850 bp des Xma 2,4 Md Bruchstücks stellen "spacer"-Sequenzen zwischen den beiden rRNA-Genen dar. Die $tRNA^{Ile}_{2}$ hybridisierte zum zentralen Teil des interzistronischen Bereiches (siehe Diskussion).


12,7
13,8
Md Sal I
6.0 Kpn I
Kpn I – Sal I
Kpn I – Pst I
Kpn I – Xmal
1,3
1,3
2,1
1,3
Md

(A)


1
2
3
4
6.0
Kpn/Pst
Kpn/Sal
(Subfragmente)
Kpn/Pst
Kpn/Sal
(Subfragmente)

(B)

Abb. 9 : Illustration einer genaueren Lokalisierung von tRNA-Genen auf dem 6,0 Md Kpn I -Fragment.

A) Physikalische Feinkarte dieses Bereiches. Die Zahlen geben die Molekulargewichte (x 10^6 d) der Fragmente bzw. Subfragmente wieder.

B) Hybridisierungsbeispiele für die Feinkartierung der $tRNA^{Trp}$ bzw. der $tRNA^{Phe}$ (Bahnen 1+2) und der $tRNA^{Leu}_1$, $tRNA^{Ser}_2$, $tRNA^{Thr}_1$ sowie der $tRNA^{Thr}_2$ (Bahnen 3+4) zu den Subfragmenten nach Verdauung des isolierten 6,0 Md Kpn I Bruchstücks mit den Endonucleasen Pst I bzw. Sal I.

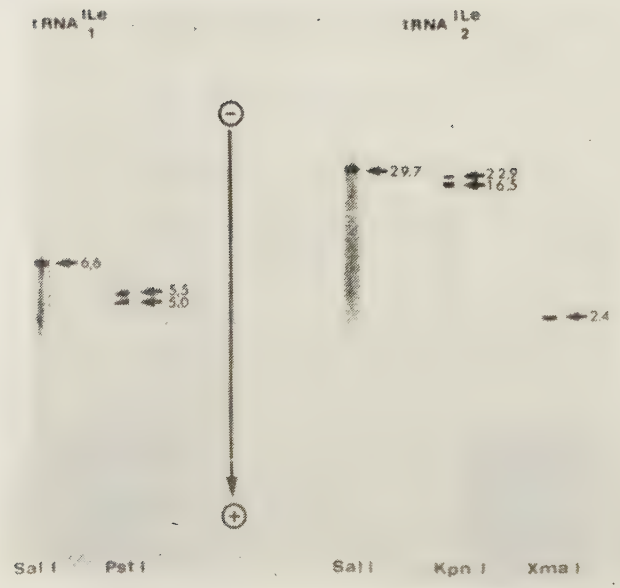


Abb. 10: Hybridisierungsstellen der $tRNA^{Ile}_{1}$ auf den Fragmenten Sal I 6,6 Md, Pst I 5,5 Md und 5,0 Md, daneben die Autoradiographien für $tRNA^{Ile}_{2}$. Letztere zeigt Hybridisierung zu den Bruchstücken Sal I 29,7 Md, Kpn I 22,9 und 16,5,sowie zu Xma I 2,4 Md. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel vergleiche Abbildung 3 (Seite 19).

Identifizierung und physikalische Kartierung von Polypeptiden

Die Gene für rRNAs und tRNAs machen zusammen nur ungefähr 13% der potentiellen Kodierungskapazität aus. Von seiner Größe her bietet das Plastidenchromosom noch ausreichend Platz für Gene von etwa 200 Proteinen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 20.000 dalton sowie für Gene regulatorischer Natur.

Zur Identifizierung und Kartierung von Polypeptidgenen auf der cpDNA, die wie einleitend erwähnt ebenfalls ein Ziel meiner Untersuchungen darstellten, gingen wir von gereinigten RNA-Spezies aus, die in heterologen, RNA-programmierten, zellfreien Translationssystemen eingesetzt wurden. Wir verwendeten zunächst den in vitro Ansatz an Weizenkeimen, der mit extern zugesetzter TMV-RNA hinsichtlich der Inkorporationsrate und den dazugehörigen Translationsprodukten reproduzierbar arbeitete. Mit Gesamt-RNA aus Plastiden wurde eine etwa 200-fache Stimulation gegenüber der Nullprobe (ohne RNA) erreicht (Filterversuche), doch konnten weder mit ^{3}H-Leucin noch mit ^{35}S-Methionin- Markierung plastidenspezifische Polypeptide eindeutig identifiziert werden. Die Syntheseprodukte waren durchweg kleiner als 30 Kd und der "background" sowie endogene Produkte des Ansatzes dominierend. Bessere Ergebnisse, d. h. definierte Banden auch höheren Molekulargewichts, wurden hingegen mit dem Reticulozyten-System aus Kaninchen erzielt, was seit einigen Monaten kommerziell erhältlich ist (s. Material und Methoden, Seite 14).

Isolation und Translation von mRNA-Komponenten aus Plastiden

In Reticulozytensystemen wurde zunächst Gesamt-RNA aus intakten Chloroplasten übersetzt und die Syntheseprodukte in einem 15%-igen SDS/Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Molekulargewichte der Translationsprodukte wurden durch Coelektrophorese mit Standard-Proteinen ermittelt, sie waren größer 60.000, 50.000, 41.000, 33.500, 26.000, 24.500 bis ca. 21.000 (breite Bande),

19.500, 17.000, 16.000, 14.000 sowie kleinere Produkte, deren Molekulargewichte nicht exakt bestimmt werden konnten. Das 15%-ige Gel lieferte in diesen Bereichen keine gute Trennung mehr. Als Hauptsyntheseprodukte wurden Banden mit den Molekulargewichten 33,5 und 55,0 Kd erhalten. Übersetzungen von poly(A^+)- und poly(A^-)-haltigen RNA-Fraktionen nach Chromatographie über eine Poly(U)-Sepharose-Säule brachten keine nennenswerten Unterschiede der Translationsprodukte (vgl. Abb.12)

Es wurde dann versucht, die gesamten plastidären RNA-Arten über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten unter nicht denaturierenden Bedingungen in Populationen unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens aufzutrennen und auf ihre Aktivität im Translationssystem hin zu studieren. Ein solcher Gradientenlauf ist in Abbildung 11 dargestellt. Die langsame Bande enthält, wie Untersuchungen in Polyacrylamidgelen zeigten, neben den tRNAs auch die ribosomalen 4,5S und 5S RNAs, die mittlere die 16S rRNA und die schnelle Bande die 23S rRNA. Diese Komponenten sind eingezeichnet, ebenfalls die Fraktionen, in die der Gradient zerlegt wurde.

Die Translationsprodukte einzelner Fraktionen des RNA-Gradienten sind in Abbildung 12 ersichtlich. Die stärksten Aktivitäten werden im Bereich von 12S bis 20S gefunden. Der Bereich um 14S enthält offenbar mehrere RNA-Populationen, darunter die mRNA für das 33,5 Kd Polypeptid (s. Diskussion). Die RNA, die *in vitro* das Polypeptid 55 Kd erzeugt, findet sich im Bereich der schweren Schulter der 16S rRNA (Fraktion b in Abbildung 11). Dieses Polypeptid copherographierte mit der grossen Untereinheit der als Standard extern zugesetzten Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase. Es zeigt im Ouchterlony-Test auch Antigenaktivität gegen monospezifischen Antikörper des Holoenzyms (in Zusammenarbeit mit Jürgen Schmitt). Unter veränderten Trennbedingungen ließ sich allerdings der Bereich um 55 Kd (bei längerer Laufzeit) in mindestens zwei radioaktive Polypeptidbanden auftrennen (vgl. Abb. 13, Pfeile). Es ist un-

geklärt, ob beide Banden der großen Untereinheit des Enzymkomplexes zugeordnet werden können, oder ob es sich hierbei um ein zusätzliches, plastomcodiertes Polypeptid, wie die α oder β Untereinheiten des CF_1-Komplexes membranlokalisierter ATP-Synthetasen handelt, die ähnliche Molekulargewichte haben (Nelson, 1976; Binder et al., 1978).

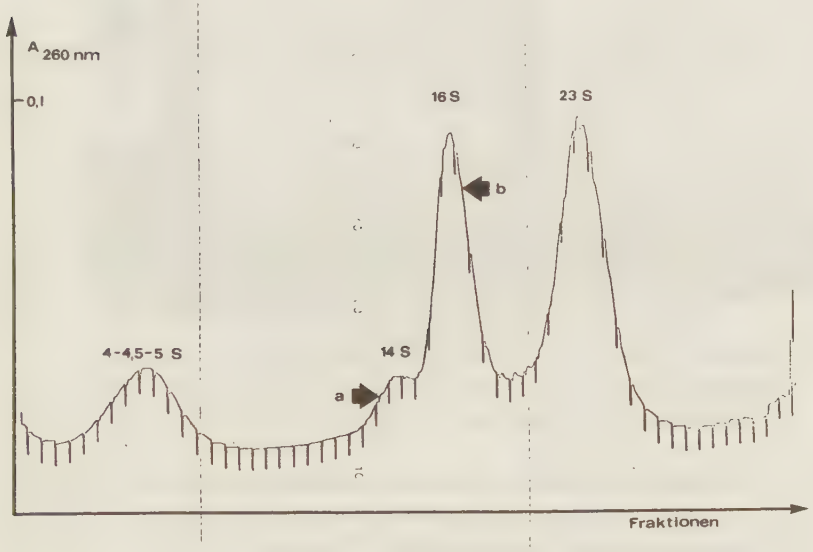


Abb. 11.: Saccharosegradient einer gesamt plastiden RNA-Population (Sedimentationsrichtung von links nach rechts).

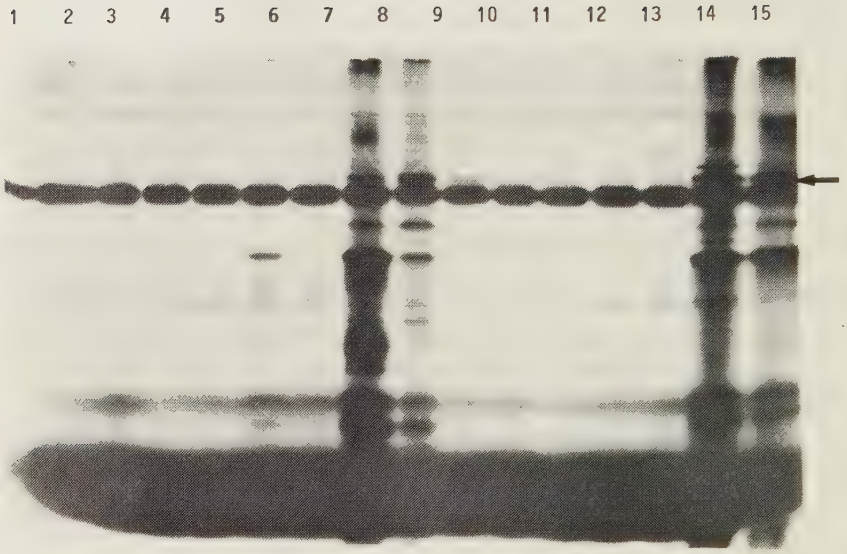


Abb. 12: Translationsprodukte plastidärer mRNA aus Spinacia. Auftrennung der in vitro synthetisierten Polypeptide auf einem 15%-igen Polyacrylamid/SDS-Gel (40 mA, 220 Volt, 7 Stunden, 21°C).
1 = Nullwert (ohne RNA), 2 = 4,5 bis 5S Bereich, 3 = 7S Bereich, 4 = 11S Bereich, 5 = Fraktion a des Saccharosegradienten, 6 = 14S Bereich, 7 und 8 liegen im 16S Gipfel, 9 = Fraktion b, 10 bis 13 enthielten im Translationsansatz RNA-Arten der Bereiche 20S, 23S und größer 23S. 14 = poly(A^+)- und 15 = poly(A^-)-haltige RNA, die im Reticulozyten-System eingesetzt wurde. Der Pfeil gibt die Lage des 55 Kd Polypeptids an.

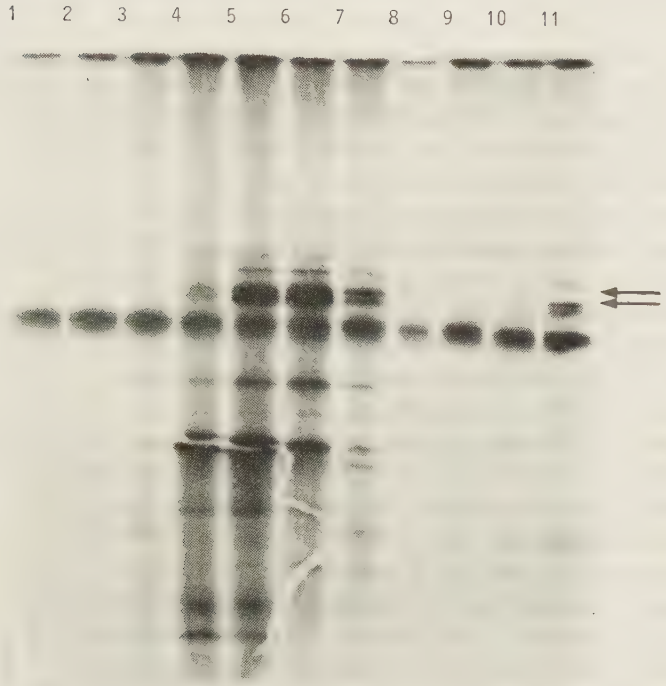


Abb. 13: Translationsprodukte plastidärer mRNA, aufgetrennt in einem 15%-igen Polyacrylamid/SDS-Gel (40 mA, 220 Volt, 12 Stunden, 21°C). Die Abbildung einer Fluorographie zeigt die Auftrennung der 55 Kd Komponente in wenigstens zwei radioaktive Polypeptide (Pfeile). 1 = Nullwert (ohne RNA), 2 = 5S Bereich, 3 = 7S Bereich, 4 = 14S Bereich, 5 = leichte Seite 16S, 6 = 16S Gipfel, 7 = schwere Schulter 16S, 8 bis 10 Bereiche größer 17 bis 23S, 11 = schwere Seite 16S einer anderen RNA-Präparation.

Lokalisation der Gene von in vitro Translationsprodukten

Zur Lokalisation der Gene für die Hauptsyntheseprodukte (33,5 und 55 Kd), wurden die RNA-Fraktionen a bzw. b (vgl. Abbildung 11) radiojodiniert und gegen auf Filter fixierte DNA-Fragmente hybridisiert. Die RNA in diesen Fraktionen ist heterogen und enthält neben den translationsaktiven RNAs für die Polypeptide 33,5 und 55 Kd mindestens noch Komponenten der rRNA-Operonen. Die Fraktion b, die vor allem das 55 Kd Produkt erzeugt, ist mindestens mit 16S rRNA verunreinigt. Die 14S RNA enthält neben Reifungsprodukten des rRNA-Transkripts (Bohnert et al., 1976) möglicherweise auch Degradationsprodukte der rRNAs, insbesondere der 23S rRNA, die im Gegensatz zur 16S rRNA als äußerst labil bekannt ist. Sie zerfällt z.B. bei Erwärmung auf 60°C im niederen Salz innerhalb von 1 bis 2 Minuten in mehrere definierte Bruchstücke, die kleiner sind als 16S aber größer als 4S RNA-Komponenten (Driesel, 1975; Mache et al., 1978; Abbildung 14). Die Hybridisierungsstudien spiegeln diese Heterogenität wieder (vgl. Abbildung 15). Unter der Annahme jedoch, daß die mRNA für das jeweilige Hauptsyntheseprodukt in diesen Fraktionen in höchster Konzentration vorliegt und alle RNA-Arten in etwa gleicher spezifischer Aktivität jodiniert werden, können die Gene von den jeweils am stärksten radiojodinierten DNA/RNA-Hybriden am Filter zugeordnet werden, die zusätzlich zu den bekannten rRNA/DNA-Hybriden entstehen.

Die RNA-Population der Fraktion a, mit der mRNA für das 33,5 Kd Polypeptid, hybridisierte zu den DNA-Fragmenten, die einer gemeinsamen Region des Moleküls, dem großen "single-copy"-Bereich nahe der Sequenzinversion, entstammen: Sal I - 5,8 Md, Pst I - 5,5 Md und Xma I - 1,7 Md. Neben den Fragmenten auf denen die rRNA lokalisiert werden konnte, sind auch noch andere Banden schwach markiert.

Gleiches galt auch für die Fraktion b, mit der RNA für das 55 Kd Polypeptid. Sie hybridisierte ebenfalls zu Fragmenten des großen "single-copy"-Bereichs aus jedoch einer anderen Region. Neben den Hybridisierungstellen für rRNA zeigte sich Komplementarität zu folgenden DNA-Banden: Sal I - 12,7 Md, Pst I - 15,7 und 7,6 Md, sowie zu Kpn I - 1,0 Md (vgl. Abbildung 15).

In der Abbildung 16 ist die Kartierung der mRNA für die Polypeptide 33,5 und 55 Kd im großen "single-copy"-Segment in Relation zu den tRNA- und rRNA-Genen wiedergegeben (Pfeile). Das 33,5 Kd Polypeptid findet sich, wie erwähnt, im Anschluß an eine Kopie der Sequenzinversion, während das Gen für das 55 Kd Protein ungefähr 31 Md von dem Genlocus des 33,5 Kd Syntheseprodukts entfernt anzuordnen ist. Der Abstand dieses 55 Kd Genes von der anderen Kopie der Sequenzinversion beträgt nahezu 17 Md.

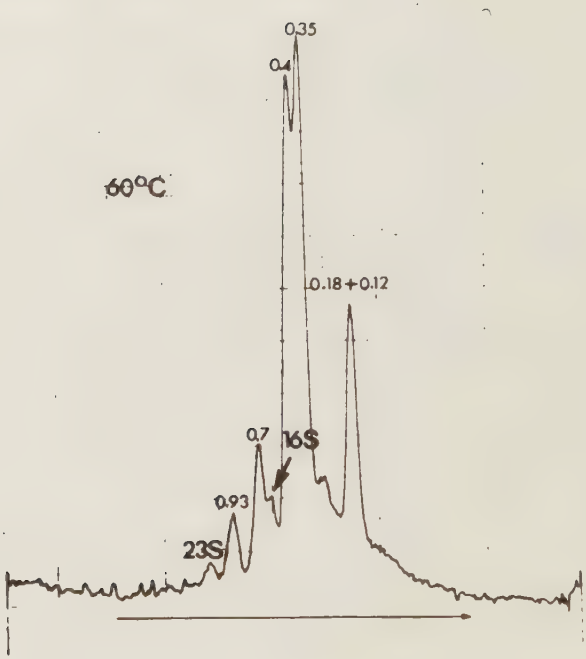


Abb. 14: Abbauprodukte der 23S rRNA aus Spinatchloroplasten. Die gereinigte und erhitzte 23S rRNA wurde auf einem 2,4%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (3,5 mA, 3,5 Stunden, 2 bis 4°C). Der Pfeil gibt die Position einer extern zugesetzten 16S rRNA an. Die Gipfel bei 0,93 und 0,7 Md stellen Zwischenstufen des Abbaus dar.

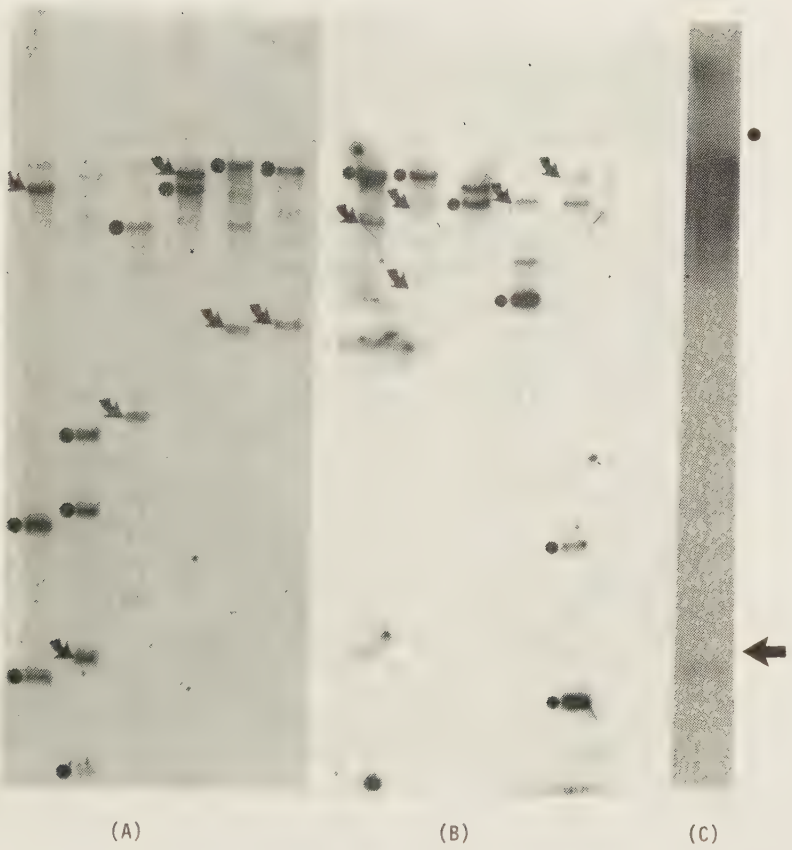


Abb. 15: Hybridisierung von Plastiden mRNA-Komponenten der Fraktionen a bzw. b an Spinat cpDNA-Fragmente. Die DNA/rRNA-Hybride sind durch Kreise (●) symbolisiert, die Pfeile hingegen zeigen die Hybridisierungsstellen der mRNAs für die 33,5 (A) bzw. 55 Kd (B+C) Syntheseprodukte an. Auf den einzelnen Filtern sind die DNA-Fragmente nach Verdauung mit folgenden Endonucleasen fixiert: (A) PVU II, Xma I, Xho I, Kpn I, Pst I, Sal I (B) Sal I, Pst I, Kpn I, Hpa I, Pvu II; (C) Kpn I.

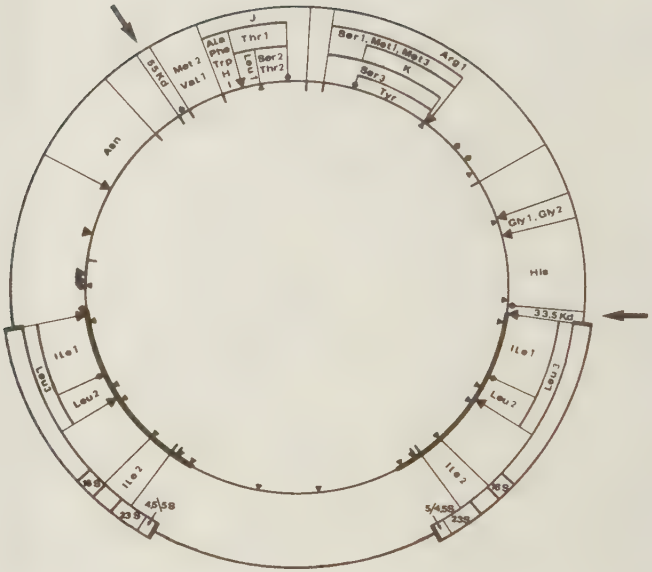


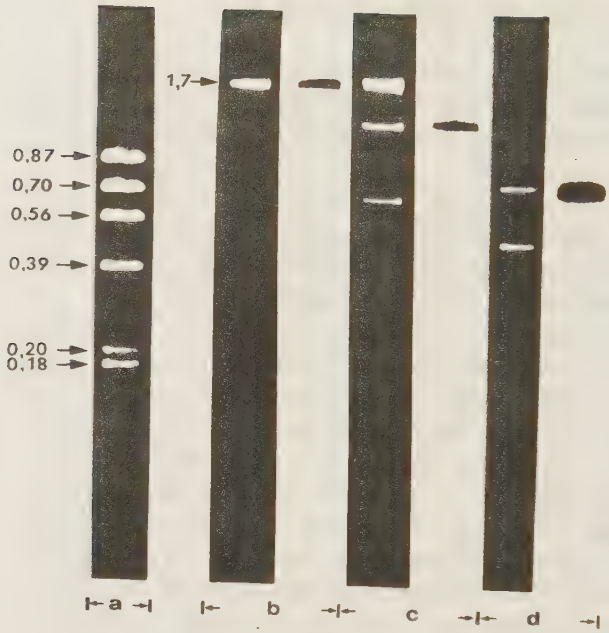
Abb. 16: Die relative Lage der Gene für die Polypeptide 33,5 und 55 Kd auf dem zirkulären cpDNA-Molekül in Relation zu den Genen für die rRNA- und tRNA-Spezies. Die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen sind wie in Abbildung 2 symbolisiert.

Feinkartierung des 33,5 und 55 Kd Polypeptids

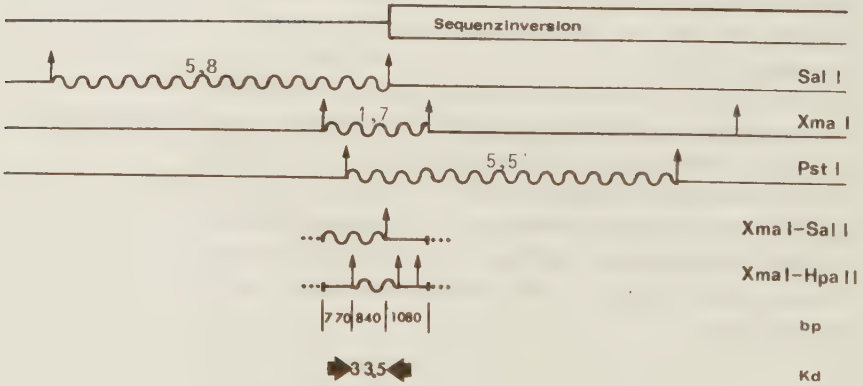
Auf der Basis der skizzierten Versuche und der Kombination von Schnittstellen weiterer Restriktionsendonucleasen auf dem cpDNA-Molekül wurde eine feinere Kartierung für diese Polypeptide angestrebt.

Für die Kartierung des 33,5 Kd Polypeptids wurde isoliertes 1,7 Md Fragment nach Verdauung der cpDNA mit Xma I als Ausgangsmaterial benutzt und mit den Endonucleasen Sal I und Hpa II nachgeschnitten. Durch Hybridisierung zu den resultierenden Subfragmenten, konnte der Locus für das 33,5 Kd Translationsprodukt weiter eingeengt werden. Die Hybridisierung erfolgte gegen das große Subfragment nach Sal I Verdauung (1,05 Md), das außerhalb der Sequenzrepetition liegt, und andererseits zu dem 0,7 Md Bruchstück nach Hpa II Verdauung. Beide Fragmente überlappen und haben einen Bereich von 840 bp gemeinsam. Dieses Stück reicht aus, um für ein maximal 40 Kd Polypeptid zu kodieren. Damit ist die exakte Lage dieses Gens im cpDNA-Molekül recht gut bestimmt (s. Abbildung 17).

Für das 55 Kd Polypeptid, dessen mRNA auf dem Kpn I Fragment (1,0 Md) hybridisierte, wurde eine feinere Kartierung des Gens mit Sac I und Nachverdauung des Kpn I, 1,0 Md Bruchstücks mit dem Enzym Pst I versucht. Die Restriktionsendonuclease Sac I schneidet außerhalb des Kpn I Fragments, Pst I schneidet dieses Fragment etwa in der Mitte. Im letzteren Fall wurde Hybridisierung zu beiden Subfragmenten erhalten, doch konnte derzeit noch keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob der Locus in die dem Kpn I, 1,0 Md Fragment benachbarten DNA-Regionen hineinreicht. An der Klärung dieser Frage wird noch weiter gearbeitet (s. Abbildung 18).


1,7
0,87
0,70
0,56
0,39
0,20
0,18
a
b
c
d

(1)


Sequenzinversion
5,8
1,7
5,5
Sal I
Xma I
Pst I
Xma I–Sal I
Xma I–Hpa II
770
840
1080
bp
33,5
Kd

(2)

Abb. 17: Feinkarte des 33,5 Kd Polypeptids auf dem Spinacia Plastidenchromosom.

(1) Hybridisierungsergebnisse auf den Subfragmenten nach Verdauung des isolierten 1,7 Md Xma I Stücks (a) Φ x 174 DNA mit Hae III verdaut (Standard), (b) 1,7 Md Xma I unverdaut, (c) Sal I Nachverdauung, (d) Hpa II Spaltung. Die Autoradiogramme sind rechts neben den Gelaufnahmen dargestellt.

(2) Lokalisierung einer mRNA auf der Spinat cpDNA. Die Wellenlinien bezeichnen die DNA-Fragmente bzw. Subfragmente zu denen eine Hybridisierung erzielt wurde (Molekulargewichtsangaben in Md).

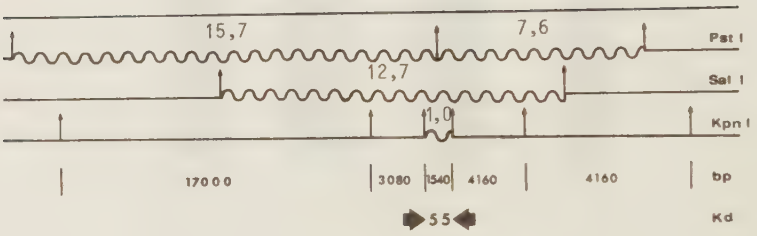


Abb. 18: Feinkarte des 55 Kd Proteins auf dem Spinacia Chloroplastenchromosom. Die Wellenlinien bezeichnen die DNA-Fragmente, zu denen Hybridisierung erzielt wurde. Die Molekulargewichte der Bruchstücke sind in Md angegeben.

Untersuchungen zur Expression plastidärer Gene während der Transformation vom Etioplasten zum Chloroplasten

Die Transformation des Etioplasten zum Chloroplasten ist mit Syntheseleistungen verknüpft, die für den Aufbau der Thylakoide und der Enzyme des Photosynthesesystems erforderlich sind. Hieran sind mit Sicherheit nucleäre Gene, wahrscheinlich aber auch plastidäre Gene beteiligt (s. Diskussion). Um auf das Letztere Hinweise zu erhalten, wurden sowohl RNA-Markierungen in vivo als auch Translationen von RNA aus Plastiden verschiedener Entwicklungsstadien in vitro studiert.

Etiolierung von Keimlingen wird heute primär an Monokotyledonen durchgeführt, weil das lanzettförmige Keimblatt einen mengenmäßig großen Anteil an Blattgewebe ergibt. Anders jedoch verhält es sich mit Dicotyledonen. Hier wurden bisher nur etiolierte Keimlinge bei Pflanzen mit großen Nährstoffreserven im Samen erhalten (z.B. Bohne), zu denen Spinat nicht zählt. Es mußten daher erst die Bedingungen für die Etiolierung von Spinatkeimlingen etabliert werden.

Anzucht von etiolierten Spinatkeimlingen

Nach anfänglichen Schwierigkeiten bei der Anzucht von Spinatkeimlingen im Dunkeln, die durch starke Verpilzung und Fäule der Pflanzen (bei 95 bis 98% relativer Feuchte) auftrat, konnten durch die Verwendung von mit Orthozid vorbehandeltem Saatgut und einer Abdeckung des Samens mit Vermikolithe, ohne Zusatz von Substraten ins Gießwasser, etiolierte Spinatkeimlinge guter, d.h. für physiologische Untersuchungen brauchbarer Qualität erhalten werden (Abbildung 19).

Die etiolierten Keimlinge hatten annähernd gleiche Größe. Das Hypokotyl ist im Mittel 5 cm hoch und die Länge der Kotyledonen beträgt ungefähr 0,8 cm (bei Getreidearten im Vergleich 10 cm und mehr). Wurden die etiolierten Keimlinge mit Weißlicht größer

10.000 Lux bis zur vollständigen Ergrünung bestrahlt, so begann die Ergrünung nahezu homogen bei allen Pflanzen, stets an der Blattbasis, und setzte sich innerhalb von vier Stunden bis zur Spitze hin fort. Die Mengenzunahme des Chlorophylls pro Gramm Frischgewicht in Abhängigkeit von der Beleuchtungsdauer wurde gemessen und in Abbildung 20 dargestellt. Nach einer relativ kurzen Anlaufphase von weniger als einer Stunde steigt die Kurve für das gesamte Chlorophyll a + b steil an. Sie erreicht nach ungefähr 20 Stunden ein Plateau und fällt dann nach weiteren 10 Stunden geringfügig ab.

Die homogene Ergrünung tritt nur auf, wenn die Anzucht bei extrem hoher Luftfeuchte (95 bis 98%) und 22^{o}C erfolgt. Kultivierungen bei 50 bis 60% relativer Feuchte verlängern die "lag"-Phase um mehrere Stunden, und eine synchrone Ergrünung der Keimlinge ist dann nicht mehr zu beobachten. Während der Ergrünungsphase erfolgte eine deutliche Längenzunahme der Keimblätter von 0,8 auf 1,5 cm. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, die nachfolgend skizziert sind, haben gezeigt, daß diese Längenzunahme zum überwiegenden Teil auf Streckungswachstum zurückzuführen ist. In dieser Zeit gehen die Zellen unter deutlicher Zunahme des Zellsaftraumes vom embryonalen- in den ausdifferenzierten Zustand über (vgl. hierzu Abbildungen 23, 24 und 28). Nach vierstündiger Belichtung sind die Keimblätter nicht nur ergrünt, sondern auch zur Photosynthese befähigt. Dies ist anhand von stichprobenartigen Untersuchungen am Ultrarotabsorptionsspektrometer und durch Fluoreszenzmessungen gezeigt worden.

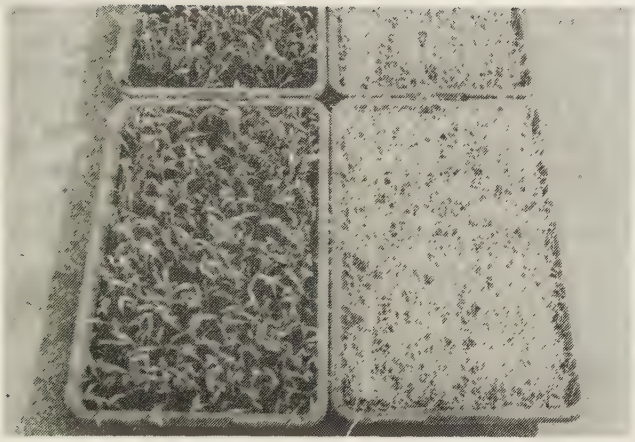


Abb. 19: Farbphotographie von etiolierten Spinatkeimlingen (rechts) und im Licht kultivierten Pflänzchen (links) des gleichen Saatguts.

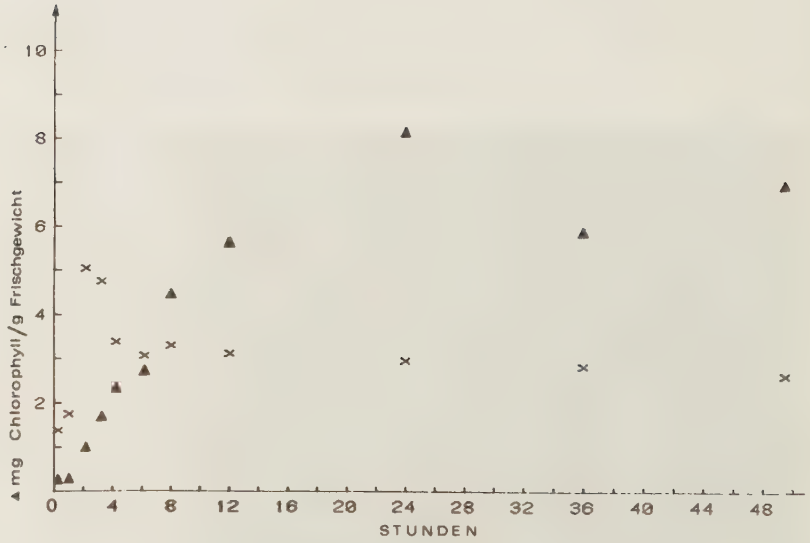


Abb. 20: Chlorophyllakkumulation (Chl_{a+b}, schwarze Dreiecke) in Abhängigkeit von der Zeit in Kotyledonen etiolierter Spinatkeimlingen nach Belichtung. Die Ergrünung wurde unter hoher Luftfeuchte (95 bis 98%) durchgeführt. Das Blattchlorophyll a/b-Verhältnis für die respektiven Beleuchtungszeiten ist mit Kreuzen wiedergegeben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an ergrünenden Spinatkotyledonen

Für die Studien zur Genexpression an cpDNA schien es sinnvoll die strukturelle Transformation während der Ergrünung mit möglichen Veränderungen im mRNA-Muster zu korrelieren. Aus diesem Grunde wurden parallel zu den biochemischen Untersuchungen jeweils eine ultrastrukturelle Studie am gleichen Material durchgeführt.

In den folgenden Abbildungen 21 bis 28 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blattquerschnitten durch das Schwammparenchym der Keimblätter von Spinacia oleracea, nach unterschiedlichen Belichtungszeiten der Keimpflanzen, dargestellt. Sie fassen die Sukzession der wesentlichen morphologischen Ereignisse zusammen. Neben den charakteristischen Transformationen findet zirka 4 Stunden nach der Belichtung eine maximale Stärkeanhäufung statt. Diese Stärkeanhäufung wird begleitet von einer Zunahme des Chlorophyll a+b Werts,und damit verbunden setzt die photosynthetische Aktivität ein.

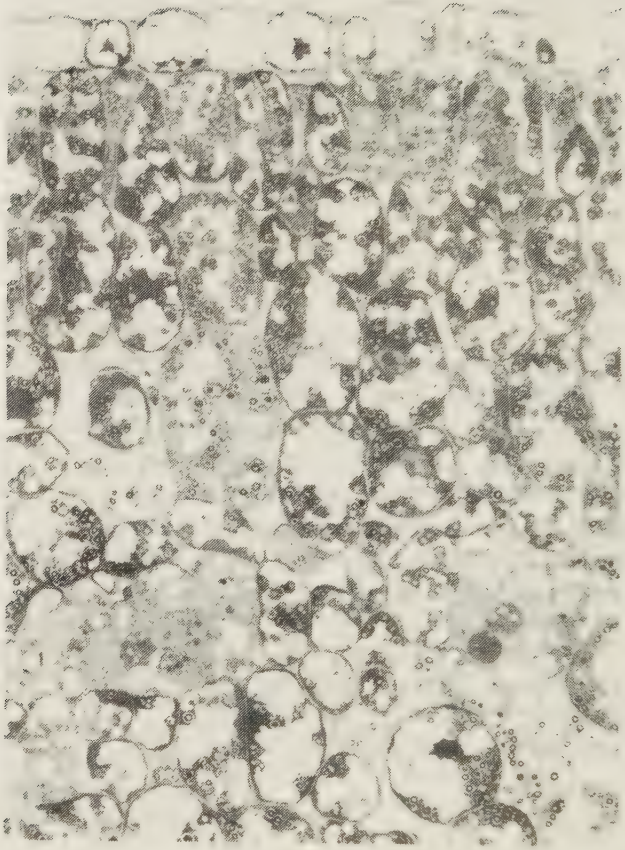


Abb. 21: Obersicht durch das etiolierte Keimblatt eines 5 Tage alten Spinatkeimlings. Etiolierte Kontrolle, Belichtung: 0-Stunden. In den Etioplasten des Palisaden- und Schwammparenchyms sind mehrere kleine Stärkekörner zu erkennen. Links und rechts im unteren Drittel des Bildes sind zwei Leitgefäße angeschnitten.
x 860

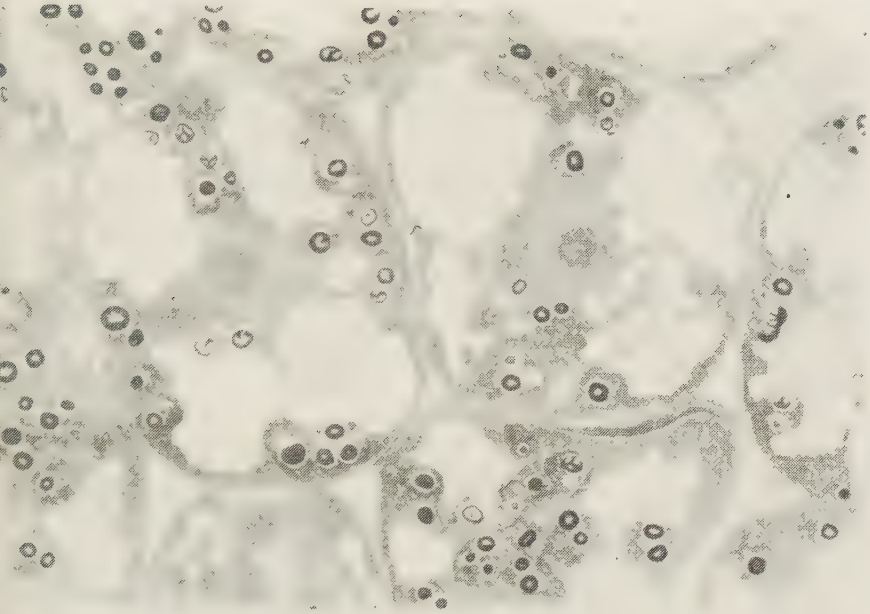


Abb. 22: Detail aus dem Schwammparenchym eines etiolierten Keimblattes von Spinacia. Etiolierte Kontrolle, Belichtung: 0-Stunden. Der Prolammelarkörper ist typisch aufgelockert. In den Amyloplasten liegen wieder mehrere Stärkekörner.
x 2.700

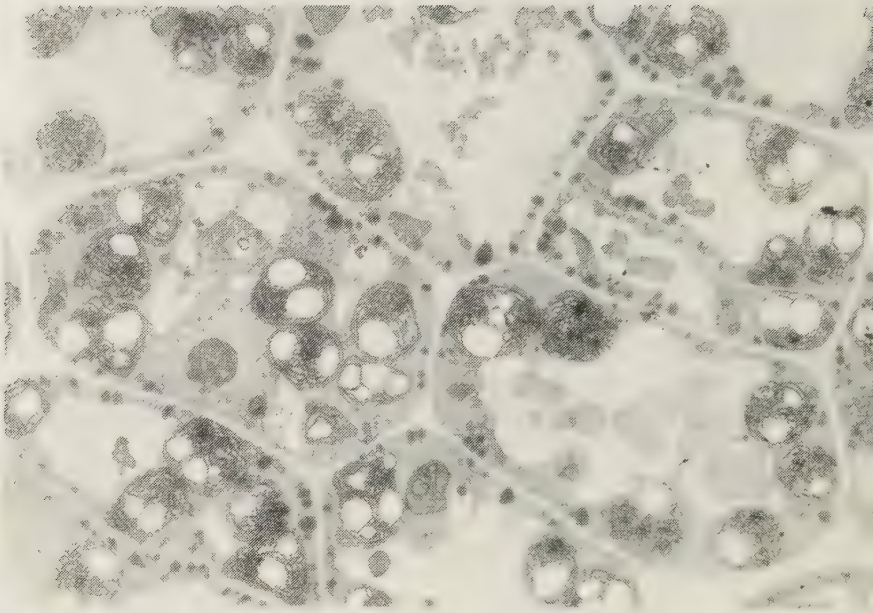


Abb. 23: Detail des Schwammparenchyms nach einer Stunde Belichtung der etiolierten Pflänzchen. Aus den Prolammelarkörpern bilden sich Primärthylakoide, die sich parallel zur Plastidenoberfläche ausrichten. Zahl und Größe der Stärkekörner entsprechen noch denen des 0-Stundenwertes. Das Vakuolensystem ist noch nicht voll entwikkelt.
x 3.700

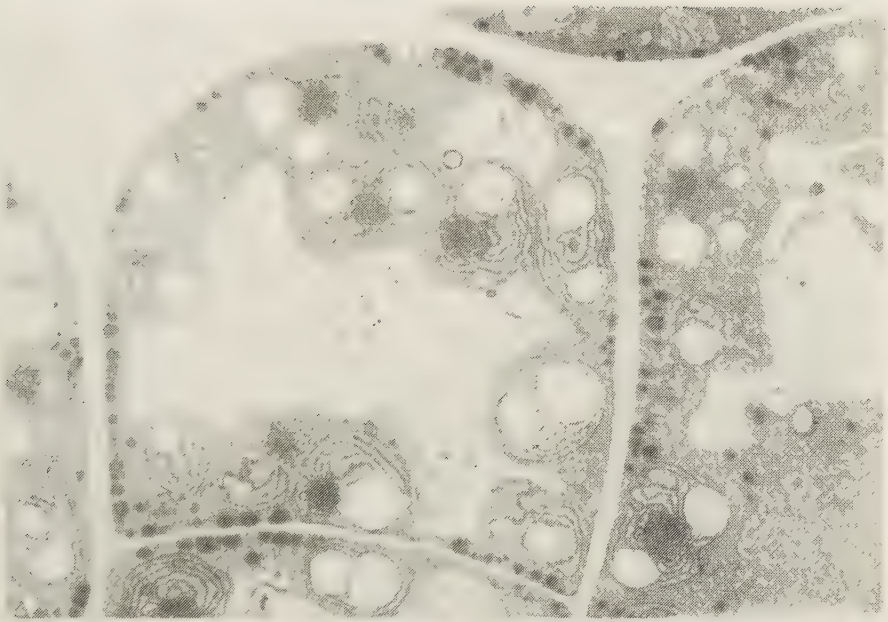


Abb. 24: Detail des Schwammparenchyms nach zwei Stunden Belichtung der etiolierten Pflänzchen. Die Anzahl der Primärthylakoide hat weiter zugenommen. Zahl und Größe der Stärkekörner entsprechen immer noch denen des Kontrollwerts. Vakuolenvergrößerung setzt ein. x 6.100

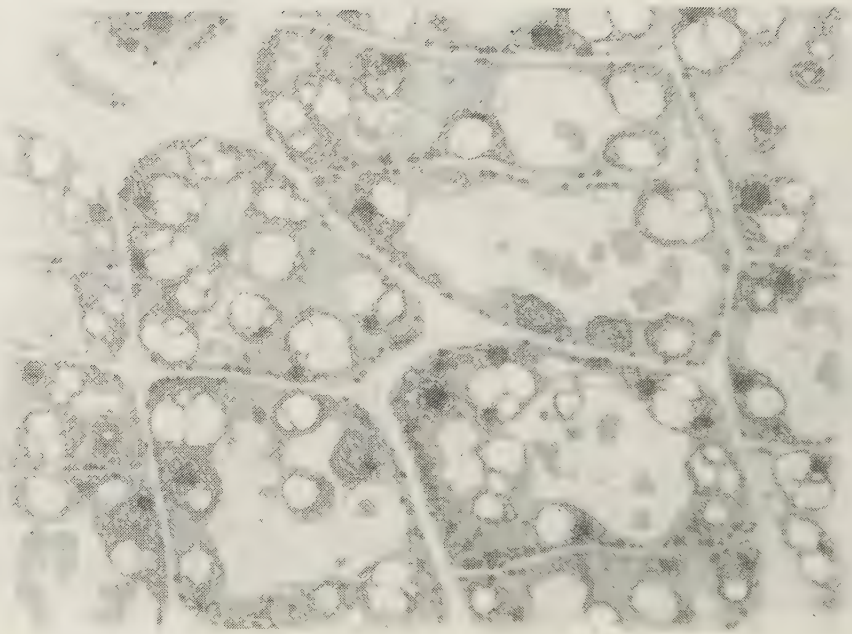


Abb. 25 und 26: Detail des Schwammparenchyms nach vier Stunden Belichtung der Keimlinge. Beginnende Bildung von Kontaktzonen (Granabildung) ist zu beobachten. Die Stärkekörner haben an Zahl und Größe zugenommen. Da sie sich infolge ihrer Größenzunahme gegenseitig berühren, haben sie eckige Kanten angenommen. Dies zeigt Abbildung 26 deutlicher.
x 3.250(25); x 4.300(26)

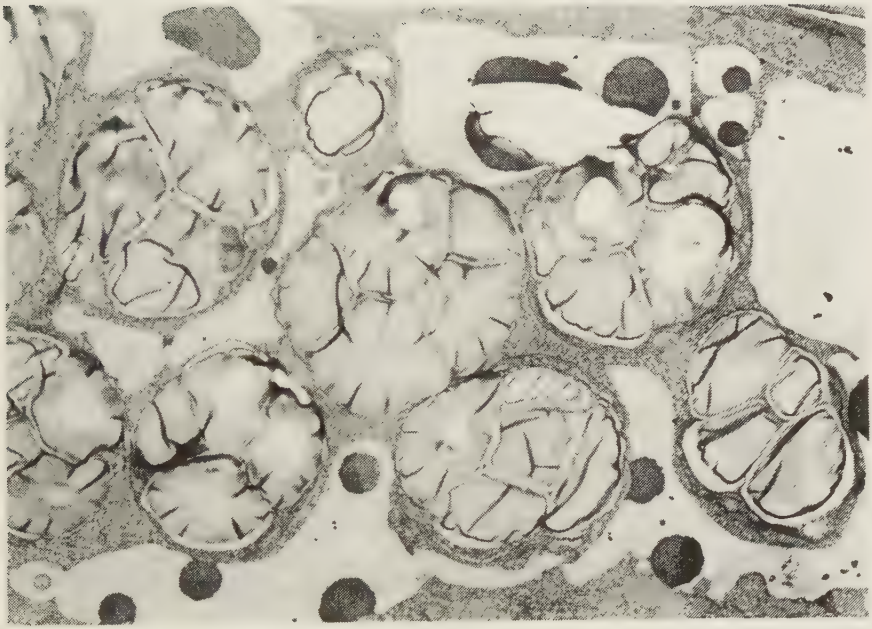


Abbildung 26

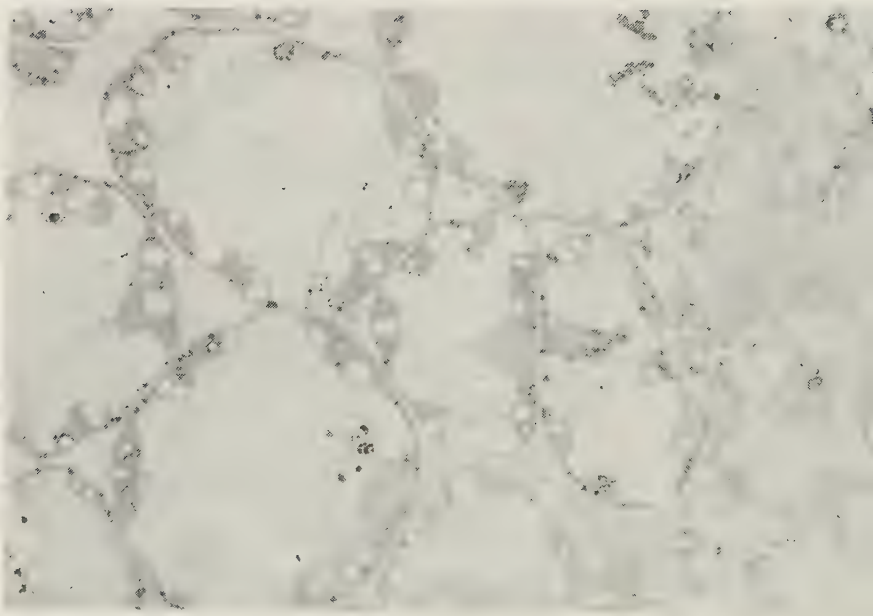


Abb. 27: Detail des Schwammparenchyms nach acht Stunden Belichtung der Pflänzchen. Zahl und Stärke der Granastapel haben zugenommen, die Prolammelarkörper sind bis auf geringe Reste desintegriert. Die Zahl und Größe der Stärkekörner hat sich wieder verringert. Unter deutlicher Zunahme des Zellsaftraumes gehen die Zellen in den ausdifferentierten Zustand über. Rechts im Bildausschnitt ist ein Leitbündel zu sehen. x 2.900

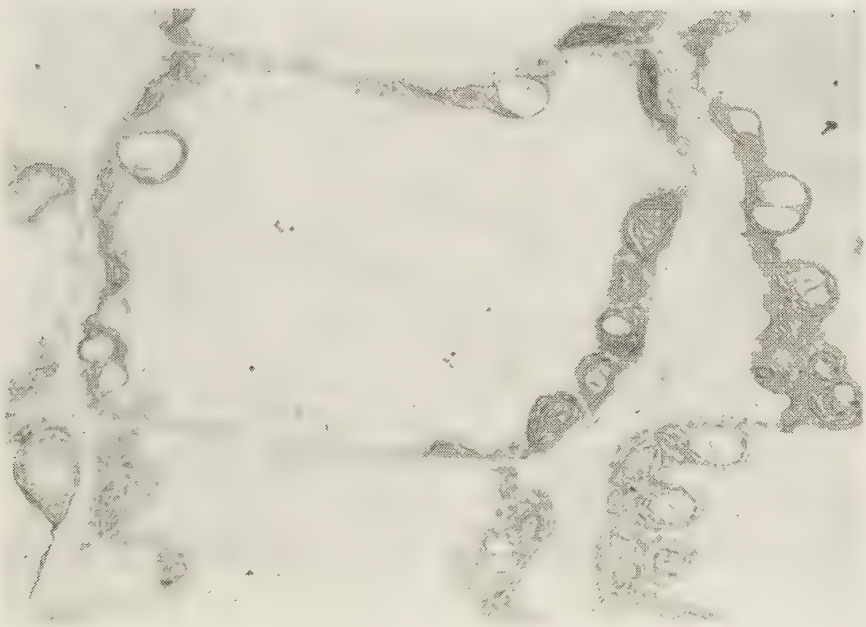


Abb. 28: Detail des Schwammparenchyms nach 24 Stunden Belichtung der Spinatkeimlinge. Die Plastiden gehen unter weiterem Abbau der Stärke in den ausdifferenzierten Zustand über.
x 3.500

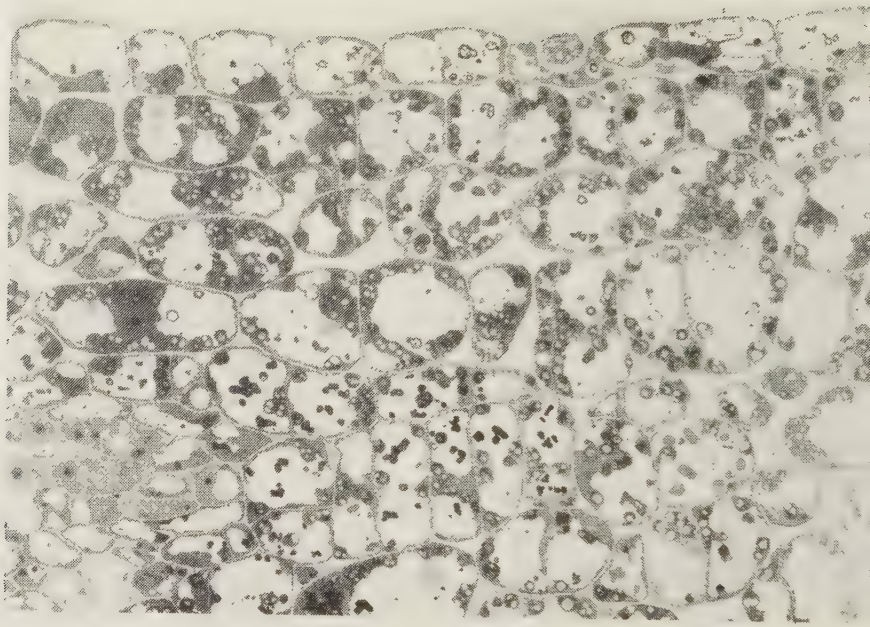


Abb. 29: Querschnitt durch das etiolierte Keimblatt eines 6 Tage alten Spinatkeimlings. Im Vergleich zur Abbildung 28 ist ein viel geringerer Differenzierungszustand der Zellen feststellbar. Anzahl und Größe der Stärkekörner entsprechen dem 0-Stundenwert (Abbildung 21).
x 1.000

In vivo Markierungsexperimente an Spinatkeimlingen

Zur Klärung der Frage ob und welche mRNAs während der Plastidentransformation nach bestimmten Zeiten der Belichtung von der cpDNA abgerufen werden oder primär vorhanden sind, wurden die etiolierten Spinatkeimlinge in vivo radioaktiv markiert und die plastidären RNAs auf Saccharosegradienten fraktioniert. Parallel dazu wurden RNA-Populationen nicht markierter Pflanzen aus gleichem Versuchsansatz im in-vitro-System translatiert und die Syntheseprodukte analysiert.

Etwa nach 8 Stunden ist ein starker, radioaktiver Gipfel bei 16S vorhanden, der erfahrungsgemäß für die hier bandierende 16S rRNA um mehr als 100% zu hoch liegt. Da die Extinktionsverhältnisse von 23S und 16S aufgrund des ungefähr gleichen GC-Gehalts (Crouse et al., 1978) 2 : 1 ausmachen, kann er nur zum Teil der ribosomalen RNA zugerechnet werden. Aus den obigen Versuchen ist bekannt, daß an dieser Stelle im Saccharosegradient eine RNA-Population bandiert, die für mehrere Polypeptide kodiert (Abbildung 30).

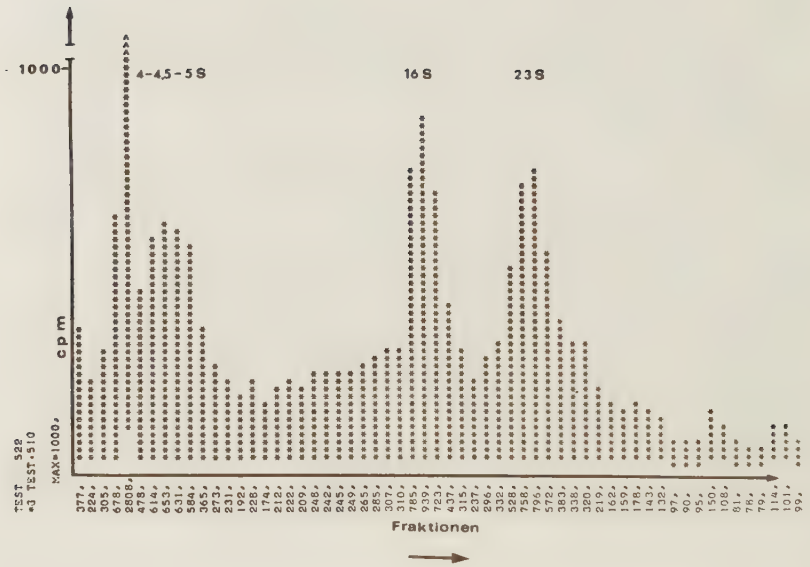


Abb. 30: Radioaktive Verteilung der in vivo transkribierten RNA-Spezies (^{3}H-Uridin) im Saccharosegradienten, nach ungefähr 8-stündiger Belichtung der Keimlinge und anschließender Extraktion der RNA aus den Plastiden von Spinacia (Zentrifugationsrichtung von links nach rechts).

Entwicklungsabhängige RNA- und Proteinsynthese

Die Analyse der nach verschiedenen Zeiten der Belichtung vorhandenen mRNAs wurde durch Translation der gesamten RNA aus Plastiden durchgeführt. Die Auftrennung der Syntheseprodukte während der Transformation der Plastiden ist in der Abbildung 31 dargestellt.

In den ersten 8 Stunden der Belichtung konnten keine markanten, radioaktiven Banden nachgewiesen werden, erst danach ließen sich Polypeptide mit den Molekulargewichten 55 Kd, 41 Kd, 33,5 Kd, 26 Kd und eine weitere Palette kleinerer, radioaktiver Polypeptidbanden nachweisen. Nach 24 Stunden wurden Komponenten am stärksten markiert, die größer sind als 60 Kd. Ein nahezu identisches Bandenmuster wurde gefunden, wenn RNAs aus Plastidenpolysomen von Primärblättern normal grüner Pflanzen translatiert wurden (vgl. Bahn 8 mit Bahn 12, Abbildung 31). Dies stützt die Annahme, daß es sich bei den hochmolekularen Polypeptiden (größer 60 Kd) um Produkte plastidärer mRNAs handelt. Die Transformation vom Etio- zum Chloroplasten ist daher von differentiellen Aktivitäten plastidärer Gene begleitet.

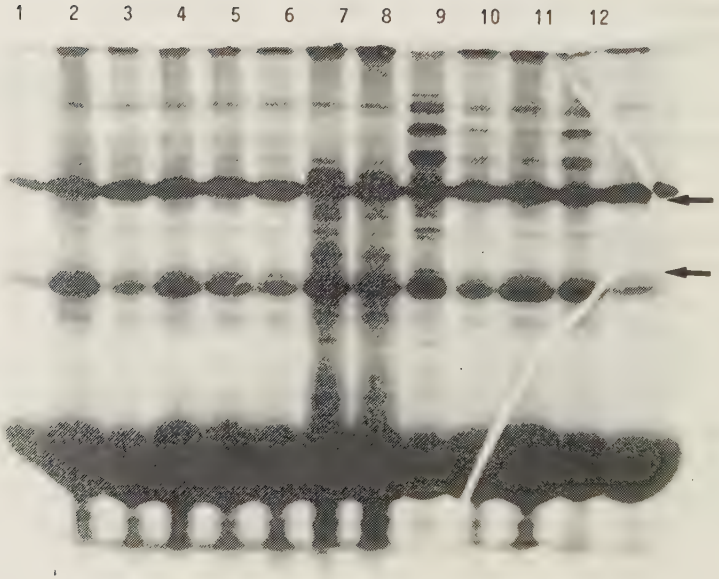


Abb. 31: Translationsmuster von RNAs aus ergrünenden Spinatkeimlingen.
1 = 0 Stunden Belichtung, 2 = 1 Stunde Belichtung,
3 = 2 Stunden Belichtung, 4 = 3 Stunden Belichtung,
5 = 4 Stunden Belichtung, 6 = 8 Stunden Belichtung,
7 = 16 Stunden Belichtung, 8 = 24 Stunden Belichtung,
9 bis 11 = RNAs aus Plastidenpolysomen und Bahn 12
Kontrolle (ohne RNA). Die Lagen des 55 Kd- und 33,5
Kd Polypetids sind durch Pfeile angegeben.

DISKUSSION

Wegen ihres überschaubaren Gehaltes an genetischer Information bieten plastidäre Erbträger gute Ansatzmöglichkeiten zum Studium der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen genetischen Kompartimenten in der autotrophen Eukaryontenzelle. Als eines der Prinzipien dieser Kooperation wurde in den letzten 2 bis 3 Jahren der duale Ursprung plastidenlokalisierter Strukturen erkannt: Untereinheiten multimerer Komponenten sind teils plastom-, teils genomkodiert. Beispiele dafür sind die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase(Coen et al., 1977), die organelleigenen Ribosomen (Freyssinet, 1976; Bogorad et al., 1977), eventuell auch die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G (Tiboni et al., 1978) sowie ein 32 Kd Membranprotein (Edelman & Reisfeld, 1978) und drei von fünf Untereinheiten des Kopplungsfaktors CF_1 (Morgenthaler et al., 1976; Ellis, 1977) sowie ferner das Cytochrom b 559 und f (Reardon et al., 1978).

Die DNA aus Plastiden kann in Form längenuniformer, zirkulärer Moleküle isoliert werden (siehe Einleitung). Elektronenmikroskopische Untersuchungen partiell denaturierter DNA-Moleküle (Tewari et al., 1977) und Restriktionsendonucleaseanalysen (Malnoe & Rochaix, 1978; Rochaix, 1978; Gray & Hallick, 1978, Rawson et al., 1978; Jenni & Stutz, 1978; Bedbrook & Bogorad, 1976, Bedbrook et al, 1977; Crouse et al., 1977) bewiesen, daß die einzellen zirkulären Moleküle einer Spezies identisch sind, wenigstens in erster Näherung, da mögliche Mikroheterogenitäten durch beide Verfahren nicht auszuschließen sind. Man ist heute bestrebt, die Funktionen dieses Chromosoms, das unter anderem an der genetischen Verankerung der Autotrophie beteiligt ist, zu identifizieren und physikalisch zu kartieren.

Physikalische Karten , konstruiert mit Restriktionsendonucleasen, die als Grundlage für die Genkartierung dienen, existieren außer

für die cpDNA von Spinacia auch noch für die von Zea mays (Bedbrook & Bogorad, 1976; Bedbrook et al., 1977), Euglena gracilis (Gray & Hallick, 1978; Rawson et al., 1978; Jenni & Stutz, 1978) und Chlamydomonas reinhardii (Malnoe & Rochaix, 1978; Rochaix, 1978). Ihr Vergleich zeigt, daß die cpDNAs der drei untersuchten Chlorophyten außerordentlich ähnlich organisiert sind. In allen Fällen liegt eine Gliederung des Moleküls in 4 Segmente vor, zwei "single-copy"-Bereiche, die eine duplizierte, invers angeordnete Sequenz trennen. Auch die Grösse der Segmente in den einzelnen cpDNAs ist ähnlich. Lediglich bei Chlamydomonas, deren cpDNA mit 62 µm das bisher größte cpDNA-Molekül repräsentiert (Behn & Herrmann, 1977), sind die beiden "single-copy"-Bereiche annähernd gleich groß und offenbar der in cpDNA höherer Pflanzen entsprechende kleinere "single-copy"-Bereich vergrößert. Die cpDNA aus Euglena, des einzigen nicht zu Chlorophyten gehörigen Vertreters, der diesbezüglich untersucht ist, hat hingegen eine dreifache Repetition von insgesamt ungefähr 17 Md in Tandemanordnung und einen grossen "single-copy"-Bereich, was eine Zweiteilung des Moleküls ergibt. Ob zwischen den drei repetitiven Segmenten noch (kleine) "single-copy"-Bereiche liegen, wird diskutiert (Crouse, pers. Mitteilung).

Auf allen genannten cpDNAs sind die rRNA-Gene lokalisiert (Bedbrook et al., 1977; Whitfeld et al., 1978; Crouse et al., 1978; Rawson et al., 1978; Rochaix & Malnoe, 1978). Sie sind jeweils zu Sätzen zusammengefaßt und in allen Fällen mehrfach, in der Repetition, vorhanden. Dem Bau der Repetitionen entsprechend enthält die Euglena cpDNA drei, die Chlorophyten cpDNAs jeweils zwei rRNA-Gensätze, im ersten Fall in Tandem - , im zweiten in inverser Anordnung. Zweifach vorhandene rRNA-Gene wurden erstmals von Thomas & Tewari (1974) durch Saturierungshybridisierungen bei cpDNAs mehrerer höherer Pflanzen festgestellt. Die Orientierung der Gensätze am Molekül ist innerhalb der unter-

suchten Chlorophyten cpDNAs einheitlich, die Anordnung der einzelnen rRNA-Gene im Operon in allen Fällen gleich. Sie lautet 16S-"Spacer"-23S-(4,5s)-5S. Bei Spinatplastiden entspricht diese Reihenfolge auch der Transkriptionsrichtung; die rDNA-Einheit wird in einem 2,7 Md großen Vorläufer transkribiert (Hartley & Ellis, 1973), der in mindestens 5 Schritten in die endgültigen rRNAs prozessiert wird (Bohnert et al., 1974; 1976). Die Größe der polyzistronischen rDNA-Einheit, die durch Restriktionsendonucleasen ermittelt wurde, entspricht in etwa der des gemeinsamen Vorläufers von 2,7 Md für die rRNA-Spezies. Das rRNA-Operon nimmt damit insgesamt knapp 40% der Sequenzrepetition und etwa 12% der potentiellen Kodierungskapazität des Moleküls ein. Die Existenz des gemeinsamen Transkripts und elektronenmikroskopische Kartierungen an Zea mays (Bedbrook et al., 1977) sowie Chlamydomonas (Rochaix & Malnoe, 1978) cp-rDNA beweisen, daß die rRNA-Gene von nur einem der DNA-Stränge abgelesen werden und sich nicht überlappen. Soweit bisher bekannt, sind sie auch kontinuierlich, ausgenommen das Gen für die 23S rRNA in Chlamydomonas cpDNA (Rochaix & Malnoe, 1978). Dort wurde innerhalb des Strukturgens für die 23S rRNA eine "intervening"-Sequenz von etwa 940 bp gefunden. Insertionen von Sequenzen in Genen extrakaryotischer DNAs wurden darüber hinaus nur noch im Gen für die 21S RNA der Ribosomen in Hefemitochondrien beschrieben (Bos et al., 1978, Bernardi, 1978).

Die Besonderheit einer vierten rRNA-Art, der 4,5S rRNA, ist für plastidäre Ribosomen mehrerer höherer Pflanzen beschrieben (Driesel, 1975; Dyer & Bowman, 1976; Whitfeld et al., 1977). In Ribosomen aus Tabak und Erbse liegt die 4,5S rRNA in äquimolaren Mengen zur 5S rRNA vor (Whitfeld et al., 1977). Die Entstehung und Funktion dieser rRNA-Art ist unbekannt, ebenso die der 3S und 7S rRNAs aus Plastidenribosomen von Chlamydomonas (Rochaix & Malnoe, 1978). Diese beiden rRNA-Komponenten liegen im interzistronischen "Spacer". Das 3S rRNA-Gen schließt unmittelbar ans 23S rRNA-Gen an, erst etwa 160 bp davon entfernt folgt der Locus für die 7S rRNA (Rochaix & Malnoe, 1977). Diese RNA-Arten, wie

auch die 4,5S rRNA, mögen Reste der RNA-Reifung darstellen. Hartley (1977) vermutet, daß die 4,5S rRNA aus der p23S RNA, einer unmittelbaren Vorstufe der 23S rRNA, abgespalten wird.

Der transkribierte interzistronische "Spacer" zwischen den Genen für die 16S und 23S rRNA ist bei Spinacia cpDNA ungefähr 1.840 bp (1,2 Md) groß, bei der von Zea mays 2.200 bp (1,4 Md), bei der von Chlamydomonas 1.700 bp (1,1 Md) und bei der von Euglena 1.240 bp (0,8 Md) und enthält im erstgenannten Falle das Gen für eine der beiden tRNA-Arten für Isoleucin. Es ist allerdings nicht klar, ob dieses Gen Bestandteil des multimeren Transkripts ist, d.h. dem gleichen DNA-Strang wie die rDNA entstammt und damit während der RNA-Reifung abgespalten wird. Sequenzen nicht identifizierter 4S RNAs finden sich auch in der analogen Region bzw. in Regionen, die rRNA-Operonen flankieren, in verschiedenen prokaryotischen DNAs (siehe auch Driesel et al., 1979), in Chlamydomonas (Rochaix & Malnoe, 1978; Rochaix, 1978) und Euglena cpDNAs (Hallick et al., 1978). Nur im Falle der E.coli DNA wurden sie als Gene für tRNA-Arten identifiziert. Der E.coli "Spacer" enthält entweder ein Gen ($tRNA^{Glu}$) oder zwei Gene ($tRNA^{Ile}$ und $tRNA^{Ala}$; Lund et al., 1976; Morgan et al., 1977), am distalen Ende des rRNA-Operons fand Morgan et al. (1978) Gene für die tRNA-Arten für die Aminosäuren Tryptophan und Asparaginsäure.

Durch die vorliegenden Studien an tRNAs und deren Genen wurden mehrere Aussagen möglich. So wurde durch die Verwendung zweidimensionaler Geltechniken zum ersten Mal die Komplexität der niedermolekularen (4S) cp-RNAs offenbar (vgl. auch Fradin et al., 1975); mit dem vorher üblichen RPC-Verfahren wurden immer nur tRNA-Spezies für einzelne Aminosäuren studiert (Weil et al., 1977).

Die Zahl von etwa 35 niedermolekularen RNAs in Spinatchloroplasten wäre ausreichend für eine komplette Ausstattung der Plastiden an tRNAs für alle Aminosäuren, die man in Proteinen findet, auch wenn man die Codedegenerierung nach der Wobble-Hypothese berücksichtigt. Danach wären mindestens 32 Spezies erforderlich (Crick, 1966). Die endgültige Beantwortung dieser Frage steht allerdings noch aus, sie hängt von wenigstens drei Voraussetzungen ab.

Erstens, es steht noch der Beweis aus, daß cpDNA tRNA-Sequenzen für alle Aminosäuren enthält. Transfer-RNAs für 16 Aminosäuren bei Zea cpDNA wurden nach Analyse von Aminosäuren bestimmt, die nach Dissoziation von cpDNA/(beladenen)tRNA-Hybriden aus dem RNA-Teil abgespalten werden konnten (Haff & Bogorad, 1976). Im Falle der Spinatchloroplasten bleibt zu zeigen, daß unter den 8 bislang nicht identifizierten, niedermolekularen (4S) RNAs Transfer-RNAs auch für die restlichen 4 Aminosäuren (Asparaginsäure, Cystein, Glutamin und Glutaminsäure) enthalten sind, und daß alle tRNAs auch zur DNA des Organells komplementär sind. Die Schwierigkeit tRNAs für manche Aminosäuren zu identifizieren beruht aller Wahrscheinlichkeit nach in der Instabilität der zugehörigen Synthetasen, die eine spezifische Beladung der Nucleinsäuren unmöglich macht. Einige 4S RNAs, darunter zwei identifizierte tRNAs für die Aminosäuren Prolin und Lysin konnten nur zu geringer spezifischer Aktivität radiojodiniert werden, so daß die DNA/RNA-Hybriden nicht nachgewiesen werden konnten. Für die Alternative, daß einzelne tRNA-Arten aus dem Cytosol in das Organell importiert würden, gibt es bislang keinen sicheren Beweis (Barnett et al., 1978).

Zweitens, die Kartierungsergebnisse an der Spinacia cpDNA zeigen bislang eine Minimalzahl von 21 Genen für tRNAs pro zirkulärer DNA. Rechnet man die 4 noch nicht identifizierten 4S RNAs (Flecken H, I, J und K) hinzu, die bei allen elektrophoretischen Auftrennungen an gleicher Stelle und in gleicher Menge vorhanden

waren, und vermutlich tRNAs darstellen, so erhöht sich die Zahl der tRNA-Gene auf 25. Es mögen weitere Gene gefunden werden, wenn die restlichen noch nicht identifizierten 4S RNA-Arten kartiert werden und tRNA-Arten, die die gleiche Aminosäure tragen (Isoakzeptoren) und zum gleichen DNA-Fragment hybridisieren, wie die $tRNA^{Ser}_{1}$ und $tRNA^{Ser}_{3}$, $tRNA^{Gly}_{1}$ und $tRNA^{Gly}_{2}$, $tRNA^{Thr}_{1}$ und $tRNA^{Thr}_{2}$; sowie die $tRNA^{Met}_{1}$ und $tRNA^{Met}_{3}$, Transkripte verschiedener Gene sein sollten. (Für posttranskriptionelle Reifung von cp-tRNAs gibt es noch keinen Hinweis.) Für andere Isoakzeptoren ($tRNA^{Ile}$, $tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Ser}_{2}$ und $tRNA^{Met}_{2}$) zeigt die Kartierungsanalyse klar, daß sie verschiedenen Loci und zumindest nicht allein posttranskriptioneller Modifikation oder Degradation entstammen. Es ist daher möglich, daß für eine gegebene Aminosäure verschiedene Codonen gelesen werden. Die Abschätzung des wahren Ausmaßes der Komplexität der tRNA-Gene setzt aber ihre Feinkartierung und die Kenntnis der Sequenz von Anticodonen voraus. Nimmt man die Plateaus saturierender Hybridisierungen als Maß, dann kann der Grad an Repetition von tRNA-Genen nicht hoch sein. Die Daten, die bei Tabak cpDNA (Tewari & Wildman, 1970; 26 Gene), Euglena cpDNA (Gruol & Haselkorn, 1976; McCrea & Hershberger, 1976; Schwarzbach et al., 1976; 20 bis 26 Gene) und Zea (Haff & Bogorad, 1976; 20 bis 26 Gene) erhalten wurden, entsprechen etwa 20 bis 35 Loci.

Drittens, selbst wenn die Komplementarität aller cp-tRNAs gesichert ist, müßte streng genommen noch bewiesen werden, daß die entsprechenden Gene auch physiologisch aktiv sind und nicht ein funktionelles Äquivalent im Zellkern haben. Die lichtabhängige Synthese von cp-tRNA und das Fehlen von cp-tRNAs in nicht mendelnden Mutanten von Euglena (Barnett at al., 1978) stützen die Eigenständigkeit plastidärer Transfer-RNA-Gene. Ihre Anhäufung in wenigen Bereichen der großen "single-copy"-Region des Moleküls könnte polyzistronische Transkriptionseinheit auch für tRNA-Gene anzeigen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Wege eingeschlagen, plastomkodierte Polypeptide (und Regulatorgene) zu identifizieren und zu kartieren. Die Hauptschwierigkeit dieser Untersuchungen besteht darin, daß die Endprodukte nicht direkt zur DNA des Organells komplementär sind. Ein viel benutzter Ansatz, plastomkodierte Polypeptide zu finden, beruhte darauf, die in der Plastide synthetisierten Produkte durch radioaktive Markierung nachzuweisen. Man ging, um die Interferenz des Kern/Cytosol-Kompartiments auszuschalten, dabei von isolierten, intakten Organellen aus, die in einem Medium resuspendiert waren, das die markierten (^{14}C oder ^{35}S) Aminosäuren enthielt (siehe u.a. Siddell & Ellis, 1975; Ellis et al., 1977; Lescure et al., 1978; Blair & Ellis, 1973; Mendiola-Morgenthaler et al., 1976; Bottomley et al., 1977) . Legt man dieses Kriterium zugrunde, dann können neben der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase (Coen et al., 1977) und dem 32 Kd Protein (Edelman & Reisfeld, 1978) auch noch wenigstens 3 der 5 Untereinheiten des membrangebundenen Kopplungsfaktors CF_1 (ATP-Synthetase; Morgenthaler at al., 1976), das Cytochrom b 559 und f (Reardon et al., 1978) und auch die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G (Tiboni et al., 1978) der Plastide entstammen. Alle diese Untersuchungen geben zwar Auskunft über den Syntheseort eines Polypeptids, jedoch streng genommen keinen Hinweis über seinen Kodierungsort. Die jeweilige mRNA könnte ja aus dem Cytosol importiert sein. Aus genetischen Untersuchungen, in denen die Erbträger von plastiden-lokalisierten-Produkten untersucht werden, gibt es - neben der großen Untereinheit des Fraktion-I-Proteins (Bottomley & Whitfeld, 1979)- Evidenz, daß auch ein oder zwei Proteine der plastideneigenen 70S Ribosomen plastomcodiert sind (Freyssinet, 1976; Bogorad et al., 1977). Die meisten der ribosomalen Proteine scheinen hingegen kernkodiert zu sein. Auch dieser Ansatz leidet unter dem Einwand, daß nicht das Strukturgen des Produkts selbst, sondern ein Gen regulatorischer oder modifizierender

Natur für den nicht mendelnden Erbgang des Produkts verantwortlich ist. Aus diesem Grunde wurden Systeme für zellfreie Proteinsynthese entwickelt (aus E.coli, Weizenkeimen und Reticulozyten), in denen plastidäre RNAs übersetzt werden können (Sagher et al., 1975; Howell et al., 1976; Reisfeld et al., 1977; Bedbrook et al., 1978; Speirs & Grierson, 1978; Link et al., 1978). Seit neuem gibt es, um Schwierigkeiten der mRNA-Isolation zu umgehen, auch DNA-programmierte Transkriptions-Translations-Systeme, die erfolgreich mit gesamt cpDNA (Bottomley & Whitfeld, 1979) oder auch mit klonierten Fragmenten der cpDNA verwendet wurden (Coen et al., 1977; Rochaix & Malnoe, 1978).

Der hier eingeschlagene Weg, die mRNAs aus Plastiden zu isolieren, einerseits in das Produkt zu übersetzen, andererseits auf der cpDNA durch Hybridisierung zu lokalisieren, geht von mehreren plausiblen Annahmen aus. Sie betreffen gleiche Jodinierungs- sowie eine konzentrationsabhängige Translationseffizienz verschiedener RNA-Arten. Für die letztgenannte Annahme diskutiert Edelman (1978), daß die am stärksten radiojodinierte RNA-Art mit dem Hauptsyntheseprodukt korreliert werden kann. Untersuchungen mit Spinacia cpDNAs im E.coli-Translationssystem liegen von Speirs & Grierson (1978) und Hartley et al. (1975) vor. Erstere fanden nur zwei Syntheseprodukte mit den Molekulargewichten von etwa 13,2 und 12,6 Kd, wenn sie 14S RNA einsetzten, Hartley et al. erhielten hingegen zwei Hauptsyntheseprodukte von 52,0 und 32,0 Kd. Die Bande um 52 Kd wurde, wie hier, als große Untereinheit des Fraktion-I-Proteins identifiziert. Bottomley & Whitfeld (1979) fanden in ihrem zellfreien Transkriptons-Translations-System, das mit gesamter cpDNA arbeitet, ungefähr 20 markierte Polypeptidbanden. Eine der Hauptbanden hatte ebenfalls ein Molekulargewicht um 55 Kd und zeigte nach proteolytischer Verdauung gleiches Spaltmuster wie die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase. Interessanterweise verschwand das radioaktive Produkt,

wenn die cpDNA mit der Restriktionsendonuclease Pst I geschnitten wurde, bevor sie in das Transkriptions-Translations-System eingesetzt wurde. In diesem Ansatz wurde ein neues Syntheseprodukt von etwa 26,0 Kd beobachtet. Wenn dieses Produkt ein Teilprodukt der großen Untereinheit des Enzymkomplexes darstellt, dann müßte die Erkennungssequenz für die Endonuclease Pst I annähernd in der Mitte des Gens für die große Untereinheit des Fraktion-I-Proteins liegen. Die Kartierung des Polypeptidgens auf der Spinat cpDNA steht im Einklang mit diesem Befund; in der vorliegenden Kartierungsuntersuchung wird das Gen für das 55 Kd Polypeptid etwa in der Mitte von Pst I geschnitten (vgl. Abbildung 18). Dieses Protein wurde auch bei Zea mays an vergleichbarer Stelle des cpDNA-Moleküls, im großen "single-copy"-Bereich kartiert (Coen et al., 1977; Bogorad et al., 1978). Auch bei Chlamydomonas konnte es im "single-copy"-Segment lokalisiert werden, doch scheint noch unklar, in welchem der beiden annähernd gleichgroßen "single-copy"-Regionen es anzuordnen ist (vgl. widersprüchliche Kartierungen Malnoe & Rochaix, 1978; Rochaix, 1978).Alle diese Kriterien zusammen lassen die Lokalisierung des Gens für die große Untereinheit des Fraktion-I-Proteins auf der Spinat cpDNA trotz der erwähnten Annahmen als korrekt erscheinen. Die kleine Untereinheit des Enzymkomplexes hingegen kommt vom Genom. Sie wird in Form eines Vorläufers synthetisiert, der unter Verlust von etwa 40 Aminosäuren in den Chloroplasten eingeschleust und dort an die plastomcodierte große Untereinheit gekoppelt wird (Chua, 1978). Der Enzymkomplex besteht aus jeweils 8 großen und kleinen Untereinheiten (Ellis, 1977).

Das zweite kartierte Gen eines Polypetids auf der Spinat cpDNA liegt ebenfalls im großen "single-copy"-Segment des Moleküls, doch an anderer Stelle als das Gen für das 55 Kd

Protein, nahe an dem Ende einer Sequenzrepetition. Die Funktion dieses Polypeptids von 33,5 Kd ist noch unbekannt. Ein Polypeptid mit ähnlichen Eigenschaften konnte aus der Thylakoidfraktion von Spirodela (Edelman et al., 1978; Reisfeld et al., 1978), Zea mays (Bogorad et al., 1978), Spinacia (Ellis & Barraclough, 1978) und Pisum (Siddell & Ellis, 1975) isoliert werden. Es handelt sich daher in allen Fällen wohl um das gleiche Produkt. Bei Zea mays cpDNA liegt das Gen für dieses Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 32 Kd an vergleichbarer Stelle (Bogorad et al., 1978).

Die mRNA für das 55 Kd Protein sedimentiert unter nicht denaturierenden Bedingungen im Saccharosegradienten auf der schwereren Seite der 16S rRNA, also im Bereich von 17 bis ungefähr 20S, wohingegen die mRNA für das 33,5 Kd Polypeptid zwischen 12 und 16S sedimentiert. Dieser Befund impliziert für die mRNAs der beiden Polypeptide, daß sie in 1,5 bis zweifach größeren Vorläufern transkribiert werden (vgl. auch Reisfeld et al., 1978). Für das 32 Kd Produkt wurden in der Tat Vorläufer mit den Molekulargewichten von 33,5 und 34,5 Kd in-vivo und in-vitro synthetisiert (Grebainer et al., 1978; Edelman & Reisfeld, 1978). Für die große Untereinheit des Fraktion-I-Proteins wäre ein Vorläuferprotein ebenfalls denkbar, doch konnte es experimentell bisher nicht nachgewiesen werden.

Beide kartierten Polypeptide stehen regulatorisch unter Transkriptions-, das Thylakoidprotein von 33,5 Kd möglicherweise auch unter Translationskontrolle (Edelman & Reisfeld, 1978). Die Aktivität der Gene schien vom Entwicklungsstand der Plastide abhängig zu sein. Aus diesem Grunde wurden in einer längeren Versuchsserie Bedingungen getestet, unter denen die Dikotyledone Spinacia etioliert werden konnte. Dabei zeigte sich, daß die Ergrünungsfähigkeit vom Alter der Spinatkeimlinge abhängig ist. Werden Keimlinge länger als 5 Tage im Dunkeln kultiviert, konnte keine homogene Er-

grünung mehr erhalten werden. Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, wurde während der Transformation vom Etio- zum Chloroplasten eine bemerkenswerte Stärkesynthese beobachtet. Diese Synthese ist lichtinduziert und mit der Etablierung des photosynthetischen Apparats gekoppelt. Die starke Stärkeanreicherung in den ersten Stunden bei der Ergrünung der Keimblätter erschwert eine Isolation von intakten Plastiden. Eine Isolation ungebrochener Organellen war erst bei hinreichender Organisation der Thylakoide (nach 8 Stunden ·) möglich. Aus diesem Grund sind die Translationsdaten für die ersten vier Stunden der Belichtung nur mit Vorbehalt zu werten. Sicher sind die mRNAs für die beiden Polypeptide von 55 und 33,5 Kd nach achtstündiger Belichtung vorhanden.

Die in bezug auf Genkartierung untersuchten cpDNAs stammen, ausgenommen die aus Euglena, von Vertretern des Chlorophytenstammbaums,dort allerdings aus ganz verschiedenen Formenkreisen (Algen, Monokotylen und Dicotylen). Vergleicht man diese cpDNAs und ihre bislang identifizierten und lokalisierten Funktionen so liegt auf den ersten Blick der Schluß nahe, daß nicht nur die physikalische Organisation des zirkulären Moleküls (siehe oben), sondern auch das Arrangement phylogenetisch konserviert ist (Ingle et al., 1970), wenigstens innerhalb der Chlorophyten. Dies betrifft die Gene für die rRNAs, für die wahrscheinlich große Untereinheit des Fraktion-I-Protein und auch für das 32 Kd Polypeptid. Für tRNA-Gene gibt es keine direkte Vergleichsmöglichkeit, da sie sonst noch bei keiner cpDNA kartiert sind. Es existieren jedoch Lokalisationsstudien von nicht identifizierten 4S RNAs aus Chlamydomonas (Rochaix, 1978). Dort verteilen sich die Sequenzen auf alle 4 Segmente, die Majorität etwa zu gleichen Teilen auf beide "single-copy"-Bereiche des Moleküls. Im Falle der Spinat cpDNA hingegen liegen die meisten tRNA bzw. 4S RNA-Gene in der großen "single-copy"-Region, in dem kleinen "single-copy"-Bereich wurde bisher kein Gen nachgewiesen. Mit allem

Vorbehalt kann man daraus schließen, daß das Arrangement von Genen in cpDNA, und damit die cpDNA selbst, phylogenetisch nicht völlig stabil ist. Offenbar gibt es auch im Plastom konservative und nicht konservative Bereiche.

ZUSAMMENFASSUNG

Die bekannte physikalische Karte des zirkulären Plastidenchromosoms von Spinacia oleracea ist durch den Wechsel repetitiver und nicht repetitiver Sequenzen in vier Segmente gegliedert, d.h. in eine Duplikation von zweimal etwa 15 Md, deren Arme invers orientiert und durch zwei "single-copy"-Bereiche unterschiedlicher Größe (etwa 12 und 52 Md) voneinander getrennt sind. Auf dieser Karte wurden bisher mindestens 35 Gene kartiert, 8 für die RNA-Arten plastidärer 70S Ribosomen, 21 für plastideneigene Transfer-RNAs, 4 bis jetzt für 4S RNAs unbekannter Funktion und 2 für Polypeptide. Die Gene verteilen sich auf die Duplikation und den großen "single-copy"-Bereich.

a) Die Gene für die ribosomalen RNAs sind in Gruppen angeordnet. Die Reihenfolge der Gene ist 16S-"Spacer"-23S-(4,5S)-5S. Dies deckt sich mit früheren Befunden, nach denen die rRNA-Gene eine polyzistronische Transkriptionseinheit darstellen (Bohnert et al., 1976). Die Transkriptionsrichtung geht vom Gen für die 16S rRNA hin zum Gen für die 23S rRNA. Pro DNA-Molekül existieren 2 rRNA-Operonen. Sie liegen in jedem Arm der Sequenzduplikation und sind invers angeordnet. Für die erst kürzlich entdeckte 4,5S rRNA wurden mindestens 4 Hybridisierungsstellen gefunden, jeweils zwei pro rRNA-Operon. Die eine davon liegt innerhalb des 23S rRNA-Gens, während die andere am distalen Ende des rRNA-Operons zwischen den Genen für die 23S und 5S anzuordnen sein dürfte (Bohnert et al., 1979).

b) Die niedermolekulare (4S) RNA aus Spinatchloroplasten kann durch zweidimensionale Auftrennung in Polyacrylamidgelen in ungefähr 35 Komponenten zerlegt werden. Von diesen sind in Zusammenarbeit mit Dr. André Steinmetz (C.N.R.S., Straßburg) 27 als Transfer-RNAs für 16 Aminosäuren identifiziert. Die tRNAs für die Aminosäuren Asparaginsäure, Cystein, Glutamin und Glutaminsäure wurden bislang noch nicht nachgewiesen. Mindestens 21 tRNA-Gene und 4 für noch nicht identifizierte 4S RNAs wurden kartiert, was eine minimale Zahl von 25 Genen für tRNAs bzw. 4S RNAs ergibt. Von diesen 25 Genen liegen 20 im großen

"single-copy"-Bereich des Moleküls, die meisten von ihnen an zwei Stellen gehäuft. Fünf tRNAs (interessanterweise alle für apolare Aminosäuren) liegen hingegen in der Sequenzrepetition, ihre Gene sind daher mehrfach vorhanden. Auch Isoakzeptor-tRNAs für eine gegebene Aminosäure können verschiedenen Loci entstammen. Von den in der Repetition lokalisierten Komponenten hybridisierte eine der beiden Isoakzeptor-tRNAs für Isoleuzin innerhalb des rDNA-Bereiches, in der "Spacer"-Region zwischen den Genen für die 16S und 23S rRNA. Dies stellt eine interessante Analogie zu bakteriellen rRNA-Operonen dar.

c) Die Gene zweier Polypeptide mit Molekulargewichten von 33,5 und 55 Kd wurden durch Hybridisierung von RNA-Fraktionen mit Aktivität im zellfreien Translationssystem (Kaninchen-Reticulozyten) identifiziert. Sie liegen ebenfalls in dem großen "single-copy"-Segment des cpDNA-Moleküls. Das Gen für das 33,5 Kd Polypeptid liegt unmittelbar außerhalb des einen Arms der Repetition. Das 55 Kd Protein, das wahrscheinlich die große der beiden Untereinheiten der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase darstellt, liegt zentraler im großen "single-copy"-Bereich, etwa 31 Md vom Locus für das 33,5 Kd Polypeptid und ungefähr 17 Md vom anderen Arm der Sequenzinversion entfernt.

Die Transformation vom Etio- zum Chloroplasten scheint von differentiellen Aktivitäten plastidärer Gene begleitet zu sein. Im RNA programmierten in-vitro-Translationssystem synthetisierten RNAs aus Plastiden unterschiedliche Polypeptidmuster. - Die Ergrünung des etiolierten Spinatmaterials erfolgte nahezu homogen, wenn die Pflanzen bei hoher Luftfeuchte angezogen wurden. Sie ist von charakteristischen Veränderungen in der Ultrastruktur, u.a. auch der Stärkebildung, sowie von der Akkumulation von Chlorophyllen und dem Einsetzen photosynthetischer Aktivität begleitet.

LITERATURVERZEICHNIS

Apel, K. & K. Kloppstech (1978)
Eur. J. Biochem. 85, 581-588

Arber, W. (1974)
Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 14, 1

Arnon, D.J. (1949)
Plant Physiol. 24, 1-15

Barnett, W.E., S.D. Schwartzbach & L.I. Hecker (1978)
Prog. in Nuc. Acid. Res. & Mole. Biol. 21,143-179

Bedbrook, J.R. & L. Bogorad (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4309-4313

Bedbrook, J.R., R. Kolodner & L. Bogorad (1977)
Cell 11, 739-749

Bedbrook, J.R., G. Link, D.M. Coen, L. Bogorad & A. Rich (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3060-3064

Behn, W. & R.G. Herrmann (1977)
Molec. gen. Genet. 157, 25-30

Bernardi, G. (1971)
Meth. Enzymol. XXI, 95-139

Bernardi, G. (1978)
Nature 276, 558

Binder, A., A. Jagendorf & E. Ngo (1978)
J. Biol. Chem. 253, 3094-3100

Bishop, D.H.L., J.R. Claybrook & S. Spiegelman (1967)
J. Mol. Biol. 26, 373-387

Blair, G.E. & R.J. Ellis (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 223-234

Bogorad, L., J.N. Davidson & M.R. Hanson (1977)
in: Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), Plenum Press, New York, 135-154

Bogorad, L., J.R. Bedbrook, D.M. Coen, R. Kolodner & G.Link (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 541-551

Bohnert, H.-J., A.J. Driesel, E.J. Crouse, K. Gordon, I. Mertens
& J.M. Schmitt (1979)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360(3), 237

Bohnert, H.-J-, A.J. Driesel & R.G. Herrmann (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria,
(Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.),
North-Holland, Amsterdam, 629-636

Bohnert, H.-J-, J.M. Schmitt & R.G. Herrmann (1974)
Portugaliae Acta Biologica 14, 71-90

Bonner, W.M. & R.A. Laskey (1974)
Eur. J. Biochem. 46, 83-88

Bottomley, W., T.J.V. Higgings, P.R. Whitfeld & C.J. Leaver (1977)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protéines chez les Végétaux,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), CNRS, Paris 413-418

Bottemley, W. & P.R. Whitfeld (1979)
Eur. J. Biochem. 93, 31-39

Bos, J.L., C. Heyting & P. Borst (1978)
Nature 275, 336-337

Burkard, G., P. Guillemaut & J.H. Weil (1970)
Biochim. Biophys. Acta 224, 184-198

Chua, N.H. (1978)
Kongreßvortrag, Marburg (Botanikertagung)

Chua, N.H. & D.J.L. Luck (1974)
in: Biosynthesis of Organell Ribosomes,
(Nomura, M., A. Tissières & P. Lengyel, eds.),
Cold Spring Harbor Laboratory, 519-539

Chun, E.H.L., M.H. Vaughan & A. Rich (1963)
J. Mol. Biol. 7, 130-141

Coen, D.M., J.R. Bedbrook, L. Bogorad & A. Rich (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,5487-5491

Coen, D.M., J.R. Bedbrook, G. Link, A. Grebanier, K. Steinbach,
A. Beaton, A, Rich & L. Bogorad (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 553-558

Commerford, S.L. (1971)
Biochemistry 10, 1993-1999

Crick, F.H.C. (1966)
J. Mol. Biol. 19,548-555

Crouse, E.J., H.-J. Bohnert, A.J. Driesel & R.G. Herrmann (1977)
in: Progress on Regulation of Developmental Processes in Plants,
Section 1, Halle (DDR), p. 87

Crouse, E.J., J.M. Schmitt, H.-J. Bohnert, K. Gordon, A.J. Driesel
& R.G. Herrmann (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 565-572

Deonier, R.C., E. Ohtsubo, H.J. Lee & N. Davidson (1974)
J. Mol. Biol. 89,619-629

Driesel, A.J. (1975)
Diplomarbeit, Universität Köln

Driesel, A.J., E.J. Crouse, K. Gordon, H.-J. Bohnert, R.G. Herrmann, A. Steinmetz, M. Mubumbila, M. Keller, G. Burkard & J.H. Weil (1979)
Gene, in Druck

Dyer, T.A. & C.M. Bowman (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, (Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.), North-Holland, Amsterdam, 645-651

Edelman, M. & A. Reisfeld (1978)
in: Chloroplast Development, (Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical Press, Amsterdam, 641-652

Ellis, R.J. (1977)
in: Nucleic Acids an Protein Synthesis in Plants, (Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), Plenum Press, New York, 195-212

Ellis, R.J. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 463, 185-215

Ellis, R.J. & R. Barraclough (1978)
in: Chloroplast Development, (Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical Press, Amsterdam, 185-214

Ellis, R.J., P.E. Highfield & J. Silverthorne (1977)
4th Int. Congress on Photosynthesis, Reading, Great Britain, 497-506

Endow, Sh.A. & R.J. Roberts (1977)
J. Mol. Biol. 112, 521-529

Fradin, A., H. Gruhl & H. Feldmann (1975)
FEBS Lett. 50, 185-189

Freyssinet, G. (1977)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protéines chez les Végétaux, (Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), CNRS, Paris 291-289

Gelvin, St., Ph. Heizmann & St.H. Howell (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3193-3197

Gray, P.W. & R.B. Hallick (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, (Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.), North-Holland, Amsterdam, 347-350

Gray, P.W. & R.B. Hallick (1978)
Biochemistry 17, 264-289

Groneberg, J. (1976)
Diplomarbeit, Universität Köln

Grebainer, A.E., D.M. Coen, A. Rich & L. Bogorad (1978)
J. Cell. Biol. 78, 734-746

Gruol, D.J. & R. Haselkorn (1976)
Biochim. Biophys. Acta 447, 82-95

Haff, L.A. & L. Bogorad (1976)
Biochemistry 15, 4105-4109

Hall, D.O. (1972)
Nature, New Biology 235, 125-126

Hallick, R.B., P.W. Gray, B.K. Chelm, K.E. Rushlow & E.M. Orozco (1978) in: Chloroplast Development, (Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical Press, Amsterdam, 619-622

Hartley, M.R. (1977)
4th Int. Congress on Photosynthesis, Reading, Great Britain, 148/9

Hartley, M.R. & C.H. Head (1979)
Eur. J. Biochem. in Druck

Hartley, M.R. & R.J. Ellis (1973)
Biochem. J. 134, 249-262

Hartley, M.R., A. Wheeler & R.J. Ellis (1975)
J. Mol. Biol. 91, 67-77

Heber, U. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 305,140-152

Herrmann, R.G., H.-J. Bohnert, A. Driesel und G. Hobom (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria,
(Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.),
North-Holland, Amsterdam, 351-359

Herrmann, R.G., H.-J. Bohnert, K.V. Kowallik & J.M. Schmitt (1975)
Biochim. Biophys. Acta 378, 305-317

Hobom, G., H.-J. Bohnert, A.J. Driesel & R.G. Herrmann (1976)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protéines chez les Végétaux,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), CNRS, Paris, 63-69

Howell, St.H., Ph. Heizmann, St. Gelvin & L.L. Walker (1977)
Plant Physiol. 59, 464-470

Ingle, J., J.V. Possingham, R. Wells, C.J. Leaver & W.E. Loening
(1970) Symp. Soc. Exp. Biol. 24, 303-325

Jenni, B. & E. Stutz (1978)
Eur. J. Biochem. 88, 127-134

Kahn, A. & D. von Wettstein (1961)
J. Ultrastruct. Res. 5, 557-566

Koenig, R., H. Stegemann, H. Francksen & H.L. Paul (1970)
Biochim. Biophys. Acta 207, 184-189

Kolodner, R. & K.K. Tewari (1972)
J. Biol. Chem. 247, 6355-6364

Kolodner, R. & K.K. Tewari (1975)
Biochim. Biophys. Acta 402, 372-390

Laemmli, U.K. (1970)
Nature 227, 680-685

Laemmli, U.K. & M. Favre (1973)
J. Mol. Biol. 80, 575-599

Laskey, R.A. & A.D. Mills (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335-341

Lescure, A.M. (1978)
Cell Differentiation 7, 139-152

Lindberg, U. & T. Persson (1972)
Eur. J. Biochem. 31, 246-254

Link, G., D.M. Coen & L. Bogorad (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical Press, Amsterdam, 559-564

Lund, E., J.E. Dahlberg, L. Lindahl, S.R. Jaskunas, P.P. Dennis & M. Nomura (1976)
Cell 7, 165-177

Mache, R., M. Jalliffier-Verne, C. Rozier & S. Loiseaux (1978)
Biochim. Biophys. Acta 517, 390-399

Malnoe, P. & J.D. Rochaix (1978)
Mol. Gen. Genet. 166, 269-275

McCrea, J.M. & C.L. Hershberger (1976)
Nucl. Acids Res. 3, 2005-2018

Mendiola-Morgenthaler, L.R., J.J. Morgenthaler & C.A. Price (1976)
FEBS Lett. 62, 96-100

Morgan, E.A., T. Ikemura, L. Lindahl, A.M. Fallon & M. Nomura (1978)
Cell 13, 335-344

Morgan, E.A., T. Ikemura & M. Nomura (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2710-2714

Rawson, J.R. & C.L. Boerma (1976)
Biochem. 15, 588-592

Rawson, J.R.Y., S.R. Kushner, D. Vapnek, N.K. Alton & C.L. Boerma
(1978) Gene 3, 191-209

Reardon, E.M., M. Bartolf, W. Ortiz, D. Santoro, R. Zielinski
& C.A. Price (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 277-282

Reisfeld, A., J. Gressel, K.M. Jakob & M. Edelman (1978)
Photochem. Photobiol. 27, 161-165

Reisfeld, A., K.M. Jakob, J. Gressel & M. Edelman (1977)
Isr. J. Bot. 26, 49

Reisfeld, A., K.M. Jakob & M. Edelman (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoglou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 669-678

Rochaix, J.-D. (1977)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protéins chez les Végétaux,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.) CNRS, Paris,

Rochaix, J.-D. (1978)
J. Mol. Biol. 126, 597-617

Rochaix, J.D. & P. Malnoe (1978)
Cell 15, 661-670

Rochaix, J.-D. & P. Malnoe (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoklou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoklou, eds.), Biomedical Press, Amsterdam, 581-586

Sagher, D., H. Grosfeld & M. Edelman (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 722-726

Sager, R. & M.R. Ishida (1963)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 725-730

Schwartzbach, S.D., L.I. Hecker & W.E. Barnett (1975)
Proc. Natl. Acad Sci. USA 73, 1984-1988

Schmid, C.W., J.E. Manning & N. Davidson (1975)
Cell 5, 159-172

Schmitt, J.M. & R.G. Herrmann (1977)
Meth. Cell Biol. (Prescott, D., ed.),
Academic Press 15, 177-200

Siddel, St.G. & R.J. Ellis (1975)
Biochem. J. 146, 675-685

Smith, H.O. & M.L. Birnstiel (1976)
Nuc. Acids Res. 3, 2387-2398

Southern, E.M. (1975)
J. Mol. Biol. 98, 503-517

Speirs, J. (1977)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protéins chez les Végétaux,
(Bogorad, L. J.H. Weil, eds.), CNRS, Paris, 425-429

Speirs, J. & D. Grierson (1978)
Biochim. Biophys. Acta 521, 619-633

Spurr, A.R. (1969)
J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43

Tewari, K.K., R. Kolodner, N.M. Chu & R.M. Meeker (1977)
in: Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), Plenum Press, New York, 15-36

Tewari, K.K., R. Kolodner & W. Dobkin (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria,
(Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.),
North-Holland, Amsterdam, 379-386

Tewari, K.K. & S.G. Wildman (1970)
in: Control of Organelle Development,
University Press, Cambridge, 147-179

Thomas, J.R. & K.K. Tewari (1974)
Biochim. Biophys. Acta 129, 554-562

Tiboni, O., G. Di Pasquale & O. Cifferi (1978)
in: Chloroplast Development,
(Akoyunoklou, G. & J.H. Argyroudi-Akoyunoklou, eds.), Biomedical
Press, Amsterdam, 675-678

Verdier, G. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 407, 91-98

Walker, D.A. (1971)
in: Meth. Enzymol. (San Pietro, A., ed.), New York, 211-220

Weber, K. & M. Osborn (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

Weil, J.H., G. Burkard, P. Guillemaut, G. Jeannin, R. Martin & A. Steinmetz (1977)
in: Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), Plenum Press, New York, 97-120

Wheeler, A.M. & M.R. Hartley (1975)
Nature 257, 66-67

Whitfeld,P.R., B.A. Atchison, W. Bottomley & Ch.J. Leaver (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria,
(Bücher, Th., W. Neupert, W. Sebald & S. Werner, eds.),
North-Holland, Amsterdam, 387-390

Whitfeld, P.R., R.G. Herrmann & W. Bottomley (1978)
Nuc. Acids Res. 5, 1741-1751

Whitfeld, P.R., C.J. Leaver, W. Bottomley & B.A. Atchison (1977)
in: Acides Nucléiques et Synthèse des Protèins chez les Végétaux,
(Bogorad, L. & J.H. Weil, eds.), CNRS, Paris, 235-241

Zeichner, M. & R. Stern (1977)
Biochemistry 16, 1378

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand am Botanischen Institut der Universität Düsseldorf unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann. Ihm danke ich für die Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und zahlreiche Diskussionen.
Herrn Prof. Dr. W. Stubbe danke ich für sein Interesse an der Arbeit, die Bereitstellung von Spinatmaterial und die Obernahme des Korreferats.
Herrn Dr. Andrê Steinmetz (CNRS, Straßburg) gilt mein besonderer Dank für die Identifizierung der Transfer-RNAs. In nahezu dreijähriger Zusammenarbeit konnten die tRNA-Arten kartiert werden.
Herrn Doz. Dr. Hans-Jürgen Bohnert möchte ich danken für die Einführungen in die Radiojodinierungs- und Hybridisierungstechniken, für viele anregende Diskussionen und Hinweise.
Herrn Prof. Dr. K.V. Kowallik sei an dieser Stelle herzlich gedankt für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, sowie seinen Hilfen bei der Anfertigung der Dünnschnitte.
Herrn Dr. Jürgen M. Schmitt habe ich für die Oberlassung von Fraktion-I-Protein und seine Zusammenarbeit bei der Identifizierung des 55 Kd Polypeptids zu danken.
Herrn Dr. Edwin J. Crouse, Herrn Dipl.Biol. Wolfgang Nellen und Herrn Karl Gordon möchte ich für ihre anregenden Diskussionen besonders danken.
Nicht zuletzt danke ich dem technischen Personal, besonders Herrn Rogmann für die Anzucht der Spinatkeimlinge, sowie Frl. Christine Michalowski, Frl. Barbara Schiller und Frl. Monika Streubel für ihre technischen Hilfen.

LEBENSLAUF

Person

Name:	Albert Josef Driesel
geboren:	23. November 1948 in Mainz
Eltern:	Gustav Driesel, Ingenieur Katharina Driesel, geb. Müller
Geschwister:	zwei ältere Brüder
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch katholisch
Stand:	verheiratet seit 1973 mit Ingeborg Driesel, geb. Hannig, Kindergartenleiterin, ein Sohn 1978

Schulbildung

Volksschule:	1955 - 1960 in Düsseldorf
Gymnasium:	1960 - 1969 in Düsseldorf
Berufsschule:	1969 - 1970 in Düsseldorf
Prüfungen:	14. 3.1967 Mittlere Reife 12.10.1970 Reifeprüfung

Berufsbildung	1969 - 1970 Auszubildender und bankkaufmännischer Angestellter

Studium

Studienort:	Universität Köln
Studienfächer:	WS 1970/71 Philosophie, Geschichte seit SS 1971 Biologie
Prüfungen:	23. März 1973 Diplom-Vorprüfung 18. November 1975 Diplom
Seit Oktober 1975:	Bearbeitung des Dissertationsthemas

Düsseldorf, den 1. April 1979

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg Hohe-Kreuz-Str. 9b

M. SCHADEL

» Tel 0951/54414 » 58461 «